

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA
Departamento de Medicina



TESIS DOCTORAL

**Impacto de los polimorfismos genéticos de las citoquinas en los
resultados del trasplante renal**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORA

PRESENTADA POR

Isabel Pérez Flores

Directores

Alberto Barrientos Guzmán
Ana Isabel Sánchez Fructoso
José Luis Santiago Álvarez

Madrid, 2016

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

PROGRAMA DE DOCTORADO EN INVESTIGACION BIOMEDICA

DEPARTAMENTO DE MEDICINA



***IMPACTO DE LOS POLIMORFISMOS GENETICOS
DE LAS CITOQUINAS EN LOS RESULTADOS
DEL TRASPLANTE RENAL***

TESIS DOCTORAL

Isabel Pérez Flores

Madrid, 2015

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

PROGRAMA DE DOCTORADO EN INVESTIGACION BIOMEDICA

DEPARTAMENTO DE MEDICINA



**IMPACTO DE LOS POLIMORFISMOS GENETICOS
DE LAS CITOQUINAS EN LOS RESULTADOS
DEL TRASPLANTE RENAL**

DOCTORANDO:

D^a Isabel Pérez Flores

DIRECTORES DE TESIS DOCTORAL:

Profesor Alberto Barrientos Guzmán

Dra. Ana Isabel Sánchez Fructuoso

Dr. José Luis Santiago Álvarez



Profesor D. Alberto Barrientos Guzmán.

Catedrático Emérito de Nefrología de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid. Exjefe de Servicio de Nefrología del Hospital Clínico San Carlos de Madrid.

Doctora Ana Sánchez Fructuoso

Responsable del Servicio/ Jefe de Sección de Nefrología del Hospital Clínico San Carlos de Madrid y Profesora asociada al Departamento de Medicina Interna de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid.

Doctor José Luis Santiago Álvarez

Responsable del Trasplante Renal en la Unidad de Gestión Clínica de Inmunología del Hospital Clínico San Carlos de Madrid.

CERTIFICAN:

Que el trabajo titulado ” **IMPACTO DE LOS POLIMORFISMOS GENETICOS DE LAS CITOQUINAS EN LOS RESULTADOS DEL TRASPLANTE RENAL**”, ha sido llevado a cabo bajo nuestra dirección por Dña Isabel Pérez Flores y reúne las condiciones exigibles para ser presentado como tesis para aspirar a la obtención del grado de Doctor por la Universidad Complutense de Madrid.

Para que conste y surta los efectos oportunos, firmamos el presente certificado.

Prof. Alberto Barrientos Guzmán Dra. Ana Sánchez Fructuoso Dr. José Luis Santiago Álvarez

Madrid 9 de Octubre del 2015.

A Eduardo por su amor incondicional

AGRADECIMIENTOS

Estaré eternamente agradecida a todas las personas que están a mi lado en el día a día, apoyándome y ofreciéndome su hombro cuando lo necesito. Gracias por confiar en mí y por hacerme sonreír.

Dar las gracias a Ana Sánchez por apoyarme, estimular mis inquietudes profesionales y brindarme su amistad y al Profesor Alberto Barrientos por creer en mí y darme siempre una oportunidad.

También agradecer a José Luis y a Cristina su paciencia para enseñarme sus conocimientos y su sabiduría en sus respectivas materias y a mis padres por hacer de mí lo que soy y ayudarme a valorar el sacrificio y el tesón.

*¿Qué es la vida? un frenesí,
¿qué es la vida? una ilusión,
una sombra, una ficción,
y el mayor bien es pequeño:
que toda la vida es sueño
y los sueños, sueños son.*

Calderón de la Barca

ACRONIMOS

ADEs: Anticuerpos donante-específicos
AntiIL2R: Antagonistas de los receptores de la IL2
CMV: Citomegalovirus
CCDA: Citotoxicidad Celular Dependiente de Anticuerpo
CPA: Célula Presentadora de Antígeno
CPT: Capilares peritubulares
DA: Donantes en Asistolia
DAMPs: Damage-associated molecular pattern molecules
DME: Donantes en Muerte Encefálica
EHW: Equilibrio de Hardy-Weinberg
EVL: Everolimus
Fc: Fracción constante o común de las inmunoglobulinas
FK: Tacrolimus
MMF: Micofenolato mofetilo
FRR: Función Renal Retardada
HLA: Human Leucocyte Antigen
IFM: Intensidad de Fluorescencia Media
IL10: Interleuquina 10
IL18: Interleuquina 18
imTOR: inhibidor de mammalian Target of Rapamycin
IFN γ : Interferon gamma
NF κ B: Nuclear Factor κ B
NK: Natural Killer
NLR: nucleotide-binding oligomerization domain receptors
P: Prednisona
PCR: Polymerase Chain Reaction
PRA: Panel Reactive Antibody
RT-PCR: Real Time PCR
RA: Rechazo Agudo
RAC: Rechazo Agudo Celular
RAV: Rechazo Agudo Vascular
RAH: Rechazo Agudo Humoral
RCT: Receptor de células T
SNP: Single Nucleotide Polymorphism
TNF α : Tumoral Necrosis Factor alfa
TGF β : Transforming Growth Factor beta
TLR: Toll Like Receptor
UNOS: United Network for Organ Sharing
VEGF: Vascular Endotelial Grow Factor
VIH: Virus de la Inmunodeficiencia Humana

INDICE

Contenido

I	RESUMEN	9
I.1	Introducción	10
I.2	Objetivos	10
I.3	Material y métodos	11
I.4	Resultados	12
I.5	Conclusiones	12
II	SUMMARY	14
II.1	Introduction.....	15
II.2	Objectives	15
II.3	Material and methods.....	16
II.4	Results.....	16
II.5	Conclusions.....	17
III	INTRODUCCION.....	18
III.1	Evolución de los resultados del trasplante renal. Factores de riesgo de rechazo agudo y función renal retardada	19
III.2	Inmunología de trasplante. Reconocimiento antigénico	22
III.2.1	Origen de la alorrespuesta: polimorfismos HLA y no HLA	22
III.2.2	Vías de presentación antigénica en trasplante	25
III.2.3	Activación linfocitaria	27
III.2.4	La memoria inmunológica celular. Inmunidad heteróloga.....	29
III.3	Inmunología del rechazo agudo celular y humoral	31
III.3.1	Rechazo celular o mediado por células T	32
III.3.2	Rechazo humoral o mediado por anticuerpos	34
III.4	Mecanismos de tolerancia inmunológica	35
III.5	Respuesta inmune en la isquemia-reperfusión	39
III.5.1	Lesión endotelial	39
III.5.2	Respuesta inmune	42
III.6	Papel de las citoquinas y su codificación genética.....	45
III.6.1	Factor de Necrosis Tumoral α (TNF α).....	45
III.6.2	Interleuquina 18 (IL18)	47
III.6.3	Interferony (IFN γ).....	48
III.6.4	Interleuquina 10 (IL10)	49
IV	JUSTIFICACION	51
V	HIPOTESIS Y OBJETIVOS	53
V.1	HIPOTESIS	54

V.2	OBJETIVO PRINCIPAL.....	54
V.3	OBJETIVOS SECUNDARIOS	54
VI	MATERIAL Y METODOS	55
VI.1	Diseño del estudio	56
VI.2	Material	56
VI.2.1	Pacientes	56
VI.2.2	Variables	57
VI.3	Métodos.....	59
VI.3.1	Ámbito de estudio y medios disponibles.....	59
VI.3.2	Metodología para la realización de biopsia renal	60
VI.3.3	Metodología para el diagnóstico histológico de rechazo.....	61
VI.3.4	Metodología para la determinación de anticuerpos anti HLA.....	64
VI.3.5	Tratamiento inmunosupresor utilizado.....	64
VI.3.6	Metodología para la determinación de carga viral de CMV y BK.....	66
VI.3.7	Metodología para el genotipado de SNPs de las citoquinas.....	68
VI.3.8	Elección de los SNPs evaluados.....	69
VI.3.9	Análisis estadístico	70
VII	RESULTADOS	76
VII.1	Análisis descriptivo de la población.....	77
VII.2	Análisis univariable y multivariable para rechazo agudo vascular	92
VII.3	Análisis univariable y multivariable para función renal retardada	97
VII.4	Análisis para infección por CMV.....	105
VII.5	Análisis para infección por BK	112
VII.6	Análisis de supervivencia de injerto.....	115
VIII	DISCUSION	120
VIII.1	SNP del TNF α -308 G/T	122
VIII.1.1	Asociación con rechazo agudo.....	122
VIII.1.2	Función renal retardada	128
VIII.1.3	Relación con resultados a largo plazo y supervivencia del injerto	129
VIII.1.4	Incidencia de infecciones virales	130
VIII.2	SNPs de IL10 -1082G/-819C/-592C	130
VIII.3	SNP de INF γ +874T/A.....	131
VIII.4	SNP -137 G/C de la IL18	133
IX	CONCLUSIONES.....	136
X	BIBLIOGRAFIA	138
XI	ANEXO	150

I RESUMEN



I.1 Introducción

En el trasplante de órganos sólidos los factores que conducen a la pérdida del injerto son muy diversos. A pesar del avance en el diagnóstico y tratamiento de los pacientes trasplantados renales, el rechazo agudo sigue siendo una de las principales causas de deterioro progresivo de la función renal. La presencia de episodios de rechazo acorta la supervivencia del injerto e, incluso, la del paciente, dado que implica la activación de un proceso inflamatorio no sólo local, sino también sistémico y obliga al incremento de la carga de inmunosupresión a administrar.

La detección de los pacientes con mayor grado de susceptibilidad al desarrollo de rechazo, puede ayudarnos a prevenirlo. No existe consenso sobre la definición de "riesgo inmunológico elevado" y que características tiene que cumplir un paciente para poder ser incluido dentro de este grupo de riesgo.

Las citoquinas, moléculas inmunomoduladoras que actúan como mediadores de la inflamación y la respuesta inmune, son secretadas por células T y macrófagos. Participan activamente en todos los procesos de la respuesta inmune, desde la activación a la diferenciación y proliferación celular. La producción de estas citoquinas se encuentra, en muchas ocasiones, sometida a una regulación genética, de tal forma que polimorfismos a nivel de las regiones promotoras o codificadoras pueden alterar los niveles de las mismas y por tanto modificar la respuesta inflamatoria y/o inmunológica ante cualquier estímulo.

I.2 Objetivos

Evaluar la influencia de polimorfismos genéticos (SNPs del inglés Single Nucleotide Polymorphism) de varias citoquinas, en los resultados del trasplante renal,



valorando su impacto en la incidencia de rechazo agudo vascular (RAV), función renal retardada (FRR) y supervivencia del injerto. Los SNPs evaluados fueron:

1. En la IL10; -1082G/A, -592C/T
2. En el TNF α ; -308G/A
3. En el IFN γ ; +874A/T
4. En la IL18; -607C/A, -137G/C.

Como objetivos secundarios, también investigamos la posible asociación de estos SNPs con la incidencia de dos infecciones virales frecuentes los primeros meses postrasplante, como son citomegalovirus (CMV) y poliomavirus BK.

I.3 Material y métodos

Se realizó un estudio observacional de cohortes retrospectivo, a partir de una base de datos prospectiva de los pacientes trasplantados de nuestra unidad. Se incluyeron 709 pacientes consecutivos que recibieron un trasplante renal en nuestro centro entre enero de 2005 y diciembre de 2013. Aquellos que habían sido trasplantados previamente, no eran de raza caucásica, tuvieron disfunción primaria del injerto o murieron en el inmediato postrasplante, fueron excluidos.

El análisis de los SNPs fue llevado a cabo mediante ensayos con sondas TaqMan® en un sistema de RT-PCR 7900HT (Applied Biosystems). Los pacientes fueron estratificados en función del genotipo de mayor y menor producción. Se utilizó un grupo control de sujetos sanos, provenientes de donantes de sangre del Hospital Clínico San Carlos, para confirmar que los datos genotípicos obtenidos se ajustaban a las frecuencias esperadas según el equilibrio de Hardy-Weinberg (EHW).



1.4 Resultados

Encontramos una asociación significativa entre el SNP del TNF α -308 G/A y el RAV en el modelo ajustado de regresión logística. Los portadores del alelo A (GA/AA) tuvieron casi tres veces más riesgo de desarrollar un RAV (OR=2,64; IC: 1,46-4,76; p=0,001) frente a los que tenían el genotipo GG.

En el análisis que evaluó el riesgo de FRR, estratificado por tipo de donante, encontramos una asociación con el SNP del TNF α -308 G/A en el caso de injertos procedentes de donantes en muerte encefálica y con la IL18 -137 G/C en los de asistolia. Mientras que para los receptores renales de donantes en muerte encefálica, los genotipos GA/AA del TNF α fueron los que se asociaron con un riesgo mayor de presentar FRR (OR=6,15; IC 95%: 1,65-22,86; p=0,007), en el caso de los de asistolia, los portadores de riesgo fueron los del alelo G del SNP -137 G/C de la IL18 (OR=2,76; IC 95%: 1,03-7,40; p=0,042).

El SNP que se asoció con infección por CMV fue el -137 G/C de la IL18, de forma que los portadores del alelo G tuvieron casi tres veces más riesgo de infección por CMV (OR=2,79; IC 95%: 1,00-7,78; p=0,05), independientemente de la presencia de otros factores de riesgo ya conocidos y a pesar de que recibieran profilaxis con valganciclovir.

No se encontró ninguna asociación significativa de los SNPs estudiados con la infección por poliomavirus BK ni con la supervivencia del injerto.

1.5 Conclusiones

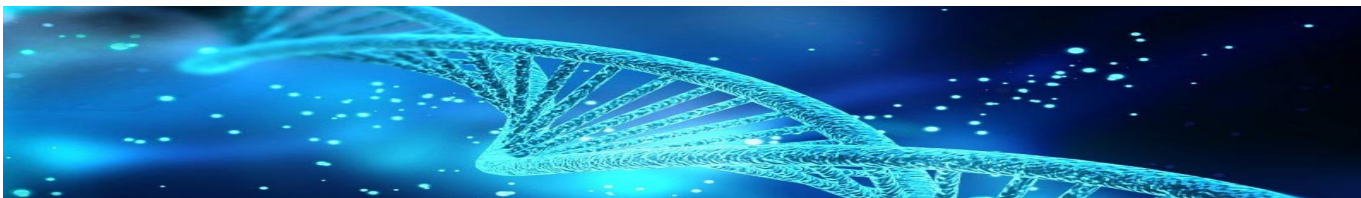
El SNP -308G/A del TNF α puede ser un biomarcador no invasivo de riesgo de RAV y, en el caso de injertos de donantes en muerte encefálica, de FRR. Por otro lado,



el SNP -137G/C de la IL18 se asocia con un riesgo mayor de FRR en los injertos de asistolia y con una incidencia más elevada de infección por CMV. El conocimiento previo al trasplante de estos polimorfismos en el receptor puede ayudarnos a individualizar el tratamiento inmunosupresor para evitar el desarrollo de complicaciones y mejorar nuestros resultados.



II SUMMARY



II.1 Introduction

In solid organ transplantation, the factors leading to graft loss are diverse. Despite progress in diagnosis and treatment of kidney transplant patients, acute rejection remains a major cause of progressive deterioration of renal function. The presence of rejection episodes reduce graft survival, and even the patient survival, since it involves activation of not only local but also systemic inflammatory process, and forces to increase immunosuppressive treatment administered.

Early detection of patients with a greater susceptibility to develop a rejection is one of the objectives pursued since it can help to prevent it. At present, there is no consensus on the definition of "high immunological risk" and which features a patient must present to be included in this risk group.

Cytokines, immunomodulatory molecules that act as mediators of inflammation and immune response, are secreted by many cells, T lymphocytes and macrophages among them. They actively participate in all processes of the immune response from activation to differentiation and cell proliferation. The production of these cytokines is, in many cases, under to genetic regulation, so polymorphisms located on promoter regions or coding region can alter their levels and thereby modify the inflammatory and/or immune response against any stimulus.

II.2 Objectives

To evaluate the influence of genetic Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) of several cytokines in renal transplant outcomes, assessing their impact on the incidence of acute vascular rejection (AVR) delayed graft function (DGF) and graft survival. The SNPs evaluated were:



1. IL10; -1082G/A, -592C/T
2. TNF α ; -308G/A
3. INF γ ; +874A/T
4. IL18; -607C/A, -137G/C.

As secondary objectives, we also investigated the possible association of these SNPs with the incidence of two common viral infections in the first months after transplantation, such as cytomegalovirus (CMV) and polyomavirus BK.

II.3 Material and methods

An observational retrospective cohort study was performed from a prospective database of patients transplanted in our unit. 709 consecutive patients who received a kidney transplant at our center between January 2005 and December 2013 were included. Those who had been previously transplanted, were not Caucasian, had primary graft dysfunction or died in the immediate post-transplant were excluded were excluded.

The analysis of SNPs was carried out using TaqMan® probe assays in a system 7900HT RT-PCR (Applied Biosystems). Patients were stratified by carrying major and minor genotype production of cytokines. Control subject group, from healthy blood donors from the Hospital Clinico San Carlos, was used to confirm that the genotypic data obtained were consistent with the expected frequencies under Hardy-Weinberg equilibrium (HWE).

II.4 Results

We found a significant association between TNF SNP -308 G / A and the AVR in the adjusted logistic regression model. Carriers of the A allele (GA / AA) were



almost three times more likely to develop AVR (OR = 2.64, CI 1.46 to 4.76; $p = 0.001$) compared with those with the GG genotype.

The analysis evaluated the risk of DGF, stratified by type of donor, we found an association with TNF SNP -308 G / A in the case of grafts from brain-dead donors and the IL18 -137 G / C from non heart beating donors. While for recipients of a graft from a brain-dead donor, the GA / AA genotypes of TNF were those who were associated with an increased risk of DGF (OR = 6.15; 95% CI: 1.65 to 22.86; $p = 0.007$), in the case of non heart beating donors, the risk carriers were the G allele of SNP -137 G / C IL18 (OR = 2.76; 95% CI: 1.03- 7.40; $p = 0.042$).

The SNP associated with CMV infection was the -137 G / C IL18, so that G allele carriers had nearly three times the risk of CMV infection (OR = 2.79; 95% CI: 1.00 to 7.78; $p = 0.05$), regardless of the presence of other known risk factors and although prophylaxis receive valganciclovir.

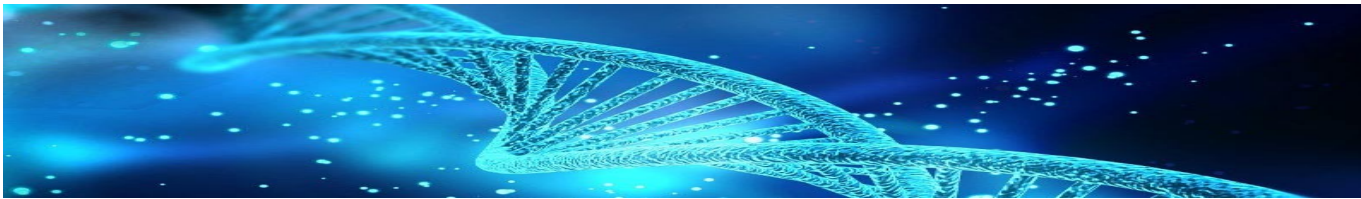
No association of the SNPs studied with BK virus infection or with graft survival was found.

II.5 Conclusions

The SNP -308G /A of TNF can be a noninvasive biomarker of risk of AVR and, in the case of grafts brain death donor, a marker of DGF. Furthermore, the SNP -137G / C IL18 is associated with an increased risk of DGF in non heart beating donors and a higher incidence of CMV infection. Transplant prior knowledge of these polymorphisms in the recipient can help to individualize the immunosuppressive therapy to prevent the development of complications and improve our results.



III INTRODUCCION



III.1 Evolución de los resultados del trasplante renal. Factores de riesgo de rechazo agudo y función renal retardada

Los avances en el campo de la inmunología y el desarrollo de potentes fármacos inmunosupresores han contribuido a una progresiva mejoría de los resultados del trasplante renal. Desde 1960, se ha incrementado la supervivencia de paciente e injerto a corto plazo, según lo demuestran los distintos registros, llegando a alcanzar porcentajes superiores al 90 y 95% durante el primer año, respectivamente¹. A pesar de estos avances, el rechazo agudo (RA) sigue siendo una de las principales causas de deterioro de la función renal y de reducción de supervivencia^{2,3}.

Un estudio comparativo reciente de resultados entre Estados Unidos y Europa, describe que la supervivencia del injerto en Europa es del 77 y 56% a 5 y 10 años, respectivamente, y del 67 y 43% en EEUU, datos muy similares a series más antiguas⁴.

El uso cada vez más extendido de riñones subóptimos, muy ligado al incremento de la edad de los donantes, puede ser otra de las causas de descenso de la supervivencia a largo plazo⁵. En las últimas décadas se ha asistido a una creciente incidencia de donantes mayores de 60 años, hasta llegar a suponer más de la mitad de los donantes en muerte encefálica en España en los últimos años, tras el marcado descenso de los accidentes de tráfico⁶. Ello implica la existencia de un mayor daño crónico del órgano, el cual es más sensible a cualquier evento tóxico o isquémico agudo. Además, estudios prospectivos han encontrado una mayor incidencia de RA en el caso de donantes mayores de 65 años⁷.

Otros factores que se han relacionado con un mayor riesgo de rechazo y una menor supervivencia es la edad y raza de los receptores y ciertos criterios inmunológicos⁸. Los receptores jóvenes muestran mayor riesgo de RA, siendo el punto



de corte entre 50-60 años el que más claramente se ha relacionado con un incremento en la incidencia de rechazo^{2, 7, 9, 10}. El ser de raza negra también implica un 22-25% más de probabilidad de experimentar un RA, frente a los pacientes de raza blanca^{9, 11}.

Entre los factores de riesgo de rechazo mejor establecidos desde el punto de vista inmunológico está la presencia de incompatibilidades HLA, tanto de clase I como II^{7, 9, 11, 12}. Cierta grado de sensibilización (PRA>0%) también ha sido ampliamente aceptado como marcador de RA en grandes series^{13, 14} y, más recientemente, la presencia de anticuerpos donante-específicos (ADEs)¹⁵.

La función renal retardada (FRR), máxima expresión de la lesión por isquemia-reperusión, también se ha relacionado con el RA y su incidencia puede verse incrementada por tiempos de isquemia fría muy prolongados (>24 horas)¹¹. El aumento de la expresión de los antígenos HLA a nivel del endotelio del injerto (debido sobre todo a la secreción de citoquinas inflamatorias como TNF- α para clase I o IL18 para clase II), derivado de un mayor daño por isquemia-reperusión, puede incrementar la alorrespuesta inmune y favorecer el desarrollo de RA, sobre todo en presencia de incompatibilidad HLA¹⁶. Se ha estimado que la FRR confiere un incremento del riesgo de RA entre un 38% y un 81%, comparado con los pacientes que presentan función renal inmediata^{10, 12, 17}. Los factores de riesgo para FRR no son los mismos que para RA. En un análisis de más de 25000 pacientes trasplantados renales de donante cadáver de la base de datos americana UNOS (United Network for Organ Sharing), los factores de riesgo independiente para FRR fueron: receptores mayores, sexo masculino, raza negra, PRA elevado, tiempos de isquemia fría prolongados y la diabetes mellitus¹⁸.

En numerosas ocasiones, a pesar de tener en cuenta todos estos factores y ajustar el tratamiento inmunosupresor al "teórico perfil de riesgo del paciente", no podemos



evitar que éste acabe desarrollando FRR y/o RA, con su potencial efecto deletéreo sobre la supervivencia del injerto.

La necesidad de adaptar e individualizar la terapia inmunosupresora a cada caso es primordial para evitar las complicaciones derivadas de un exceso o defecto de inhibición del sistema inmune. Sin embargo, las herramientas diagnósticas de las que disponemos en la práctica clínica habitual para conocer la situación de inmunosupresión del paciente son indirectas. Habitualmente nos basamos en la superficie corporal o peso del paciente y en los niveles séricos de los fármacos para calcular dosis de inicio y ajustar el tratamiento, sin tener en cuenta las variaciones en la susceptibilidad inter e intraindividual. Esto explica porque pacientes con similar riesgo inmunológico a priori, la misma combinación de fármacos e idénticos niveles séricos sufren un rechazo agudo o crónico, mientras que otros mantienen su función renal estable.

La hipótesis de que existe una susceptibilidad inherente a nuestra carga genética explicaría la gran variabilidad clínica y la diferente respuesta y evolución de pacientes trasplantados, con aparentemente idénticas características, a un mismo esquema terapéutico. La identificación de estos factores genéticos podría ayudarnos a personalizar la terapia inmunosupresora desde el inicio, reduciendo el riesgo de rechazo y de complicaciones infecciosas o tumorales.

El sistema inmune está regulado por una serie de citoquinas, que juegan un papel clave como mediadores e inmunomoduladores en la activación y diferenciación celular, participando directamente en el proceso del rechazo en el trasplante¹⁹⁻²¹. Existen numerosas evidencias de que la cantidad y diversidad de citoquinas secretadas por un individuo ante un determinado estímulo están sujetas a regulaciones genéticas. Desde hace unos años, estudios genéticos en humanos han revelado que la presencia de



polimorfismos en la región promotora de los genes que codifican citoquinas clave, pueden influenciar su producción²². Lo que resulta más controvertido es si algunos de estos polimorfismos pueden tener un impacto clínico en los resultados en la población trasplantada y, en concreto, en los receptores de trasplante renal.

Para poder comprender la influencia de las distintas citoquinas en los resultados del trasplante y su papel como reguladores pleiotrópicos del sistema inmune, vamos a profundizar en el campo de la inmunología del trasplante.

III.2 Inmunología de trasplante. Reconocimiento antigénico

III.2.1 Origen de la alorrespuesta: polimorfismos HLA y no HLA

El sistema inmunitario es una organización compleja formada por un conjunto de células y factores proteicos cuyo objetivo último es la defensa frente a la invasión por patógenos y por lo tanto imprescindible para la supervivencia de cualquier especie. La eficacia de este sistema se basa en la capacidad para detectar, identificar y eliminar cualquier elemento patógeno peligroso para el individuo²³.

La detección de la presencia de intrusos es llevada a cabo fundamentalmente por el **sistema inmune innato**, que incluye un grupo de células (monocitos/macrófagos, neutrófilos y células NK) y un conjunto de moléculas entre las que destacan las proteínas del complemento.

La identificación depende básicamente de la **respuesta inmune adaptativa o adquirida**. Este sistema también está formado por un grupo de células (linfocitos T y B) y por una serie de moléculas entre las que destacan los anticuerpos o inmunoglobulinas.



En teoría, los órganos trasplantados entre individuos de una misma especie no activarían la respuesta inmune innata. Sin embargo, en el alotrasplante se producen una serie de situaciones especiales en las que el sistema innato podría intervenir.

En primer lugar tanto en el proceso de muerte del donante como en el posible contacto con patógenos durante la donación son procesos que pondrían en funcionamiento los mecanismos innatos del donante que podrían pasar al receptor.

En segundo lugar, aquellos patógenos, sobre todo virus latentes, que han permanecido bajo control en el donante, al llegar al receptor a través del órgano podrían escapar al control del sistema inmune del receptor y activar el sistema innato del receptor. En definitiva, si bien un órgano alogénico no debería activar la respuesta inmune innata en el receptor, tanto las activaciones producidas en el donante como los patógenos latentes en el órgano podrían ser factores que podrían actuar como desencadenantes de la respuesta inmune innata en el receptor.

El alotrasplante induce en el receptor una respuesta inmune llamada rechazo, que si no es tratado produce la destrucción del órgano trasplantado. Este **rechazo del injerto es debido básicamente a una respuesta adaptativa**, siendo las moléculas del HLA los principales antígenos reconocidos por el donante. Estas moléculas además de ser las más polimórficas dentro de la especie humana, son elementos fundamentales en la respuesta inmune adaptativa ya que forman parte de los complejos encargados de la presentación antigénica²⁴.

La antigenicidad del sistema HLA viene condicionada por varias razones:

- 1) Cada individuo posee 2 juegos de varios genes que codifican las moléculas HLA.
- 2) La mayoría de estos genes tiene decenas de alelos diferentes.



- 3) Cada alelo difiere de otros alelos entre 10 y 20 aminoácidos.
- 4) Su expresión en la membrana y su peculiar función de molécula presentadora de péptidos a los linfocitos.

Todos estos factores las hacen particularmente inmunogénicas, hasta el punto de que el número de precursores de linfocitos T que se activa frente a un estímulo alogénico HLA es muy elevado (de 1/100 a 1/10.000).

Las moléculas del sistema HLA, que habitualmente se estudian, están codificadas en 6 locus diferentes, de los que cada individuo posee dos alelos, uno procedente del padre y otro de la madre. Cada locus se identifica por letras (A, B, C, DR, DP y DQ) y cada alelo se identifica con un número.

Los genes *HLA* de clase I (locus A, B, C) se expresan en la membrana de todas las células nucleadas y su función fisiológica es presentar antígenos (o péptidos) intracelulares (ej.: virus) a los linfocitos T CD8⁺ citotóxicos. Los HLA-clase-II (locus DR, DP, DQ) se expresan de forma constitutiva en las células presentadoras de antígenos (monocitos, células B y células dendríticas) y de forma inducible en otras células (como las células del endotelio vascular); su función fisiológica es presentar antígenos extracelulares a los linfocitos T CD4⁺ colaboradores (Figura 1).



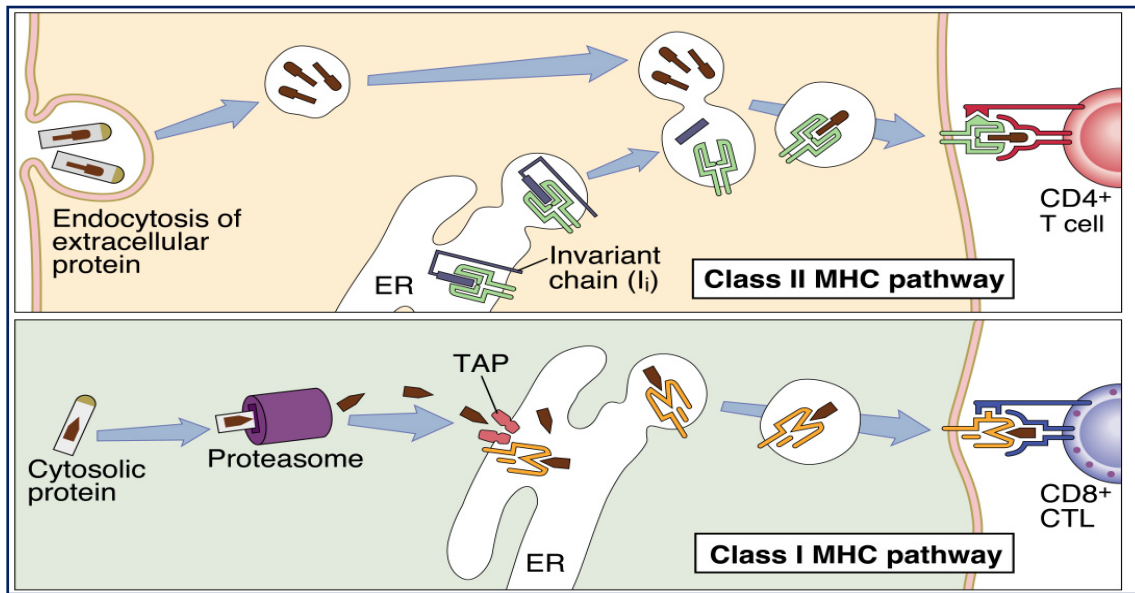


Figura 1. Moléculas HLA de clase I y II.

III.2.2 Vías de presentación antigénica en trasplante

Los linfocitos T son las células que iniciarán y mediarán la alorrespuesta inmunológica²⁵. El alorreconocimiento antigénico de moléculas HLA será realizado por el linfocito T (principalmente, en los ganglios linfáticos) mediante 3 vías diferentes de presentación:

1. **Por vía directa:** las células presentadora de Antígeno (CPA) alogénicas presentan los péptidos a través de las moléculas de HLA directamente a los linfocitos T del receptor.

2. **Por vía indirecta,** las CPA del receptor presentan las moléculas de HLA y péptidos alogénicos a los linfocitos T del receptor después de haberlos captado y procesado en su interior.

3. **Por vía semiindirecta,** ciertas CPA profesionales (células dendríticas) e incluso células endoteliales del receptor tienen capacidad de adquirir y expresar en la



superficie celular moléculas HLA alogénicas y las presentan de forma directa a los linfocitos T del receptor.

El reconocimiento antigénico por vía directa es el responsable de desencadenar una alorrespuesta (tanto proliferativa como secretora de citoquinas efectoras) de mayor vigorosidad que la producida tras el alorreconocimiento por vía indirecta. Dado que el reconocimiento por vía directa requiere de la presencia de CPA del donante, se ha postulado que esta vía es la que predominaría durante el periodo inicial del trasplante y sería también la responsable principal durante los episodios de rechazo agudo del injerto. Por otro lado, dado que la vía indirecta depende de las CPA del propio receptor²⁶, ésta estaría presente durante todo el periodo postrasplante, y tendría especial relevancia a largo plazo, siendo la responsable así del rechazo crónico del injerto (Figura 2). No obstante, trabajos recientes apuntan que el alorreconocimiento antigénico directo podría estar presente también a largo plazo, siendo las células endoteliales del injerto e incluso las propias CPA del receptor las que adquirirían capacidad de presentar el aloantígeno crónicamente por vía directa. Esta tercera vía se ha denominado vía semidirecta de alorreconocimiento antigénico.

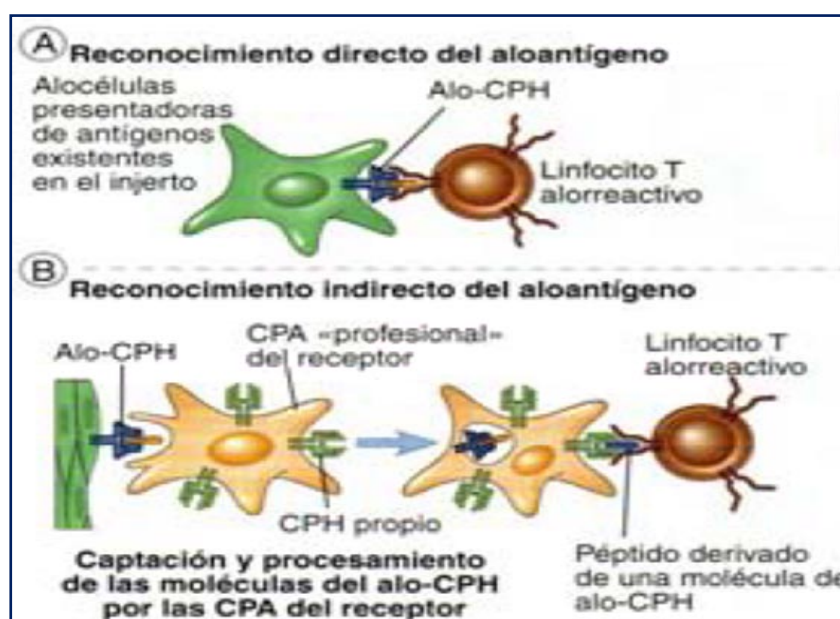


Figura 2. Vías de reconocimiento antigénico.



III.2.3 Activación linfocitaria

Para que se produzca la activación completa del linfocito T y se inicie la *alorrespuesta* inmunológica efectora, el linfocito T deberá recibir una cascada de señales e interacciones específicas con las CPA. La **primera señal** es la producida mediante la interacción entre las moléculas de HLA de las CPA y el receptor de la célula T (RCT-CD3). Esta interacción inducirá la diferenciación funcional de 2 tipos de subpoblaciones linfocitarias CD4+, según el predominio de secreción de determinadas citoquinas:

- El subtipo Th1 que característicamente secretarán IFN γ ,
- El subtipo Th2 que secretarán IL4

El predominio de una **respuesta Th1**, llevará hacia un *mecanismo efector celular* y en cambio, un predominio de **alorrespuesta Th2** activaría un *mecanismo efector humoral*. Así, los linfocitos B activados por el antígeno y ayudados por la colaboración de los T CD4+ activados, especialmente por las citoquinas que secretan los Th2 (IL4), dan lugar a la producción de anticuerpos.

Recientemente, ha sido descrita otra subpoblación linfocitaria T CD4+ (Th17), que aparecería en el contexto de un ambiente rico en IL23, TGF β e IL6. Esta subpoblación linfocitaria, productora de citoquinas proinflamatorias (IL17, IL22 y TNF α), es responsable de inducir varios trastornos autoinmunitarios y parece podría tener un papel importante en el desarrollo de episodios de rechazo agudo al inducir la granulopoesis y la migración leucocitaria hacia tejidos inflamados, sobre todo en situaciones en que la respuesta Th1-IFN γ se encontrara inhibida. Además, esta vía tendría un efecto contrario a la generación de células T reguladoras (Tregs) debido a la presencia de IL6 (Figura 3).



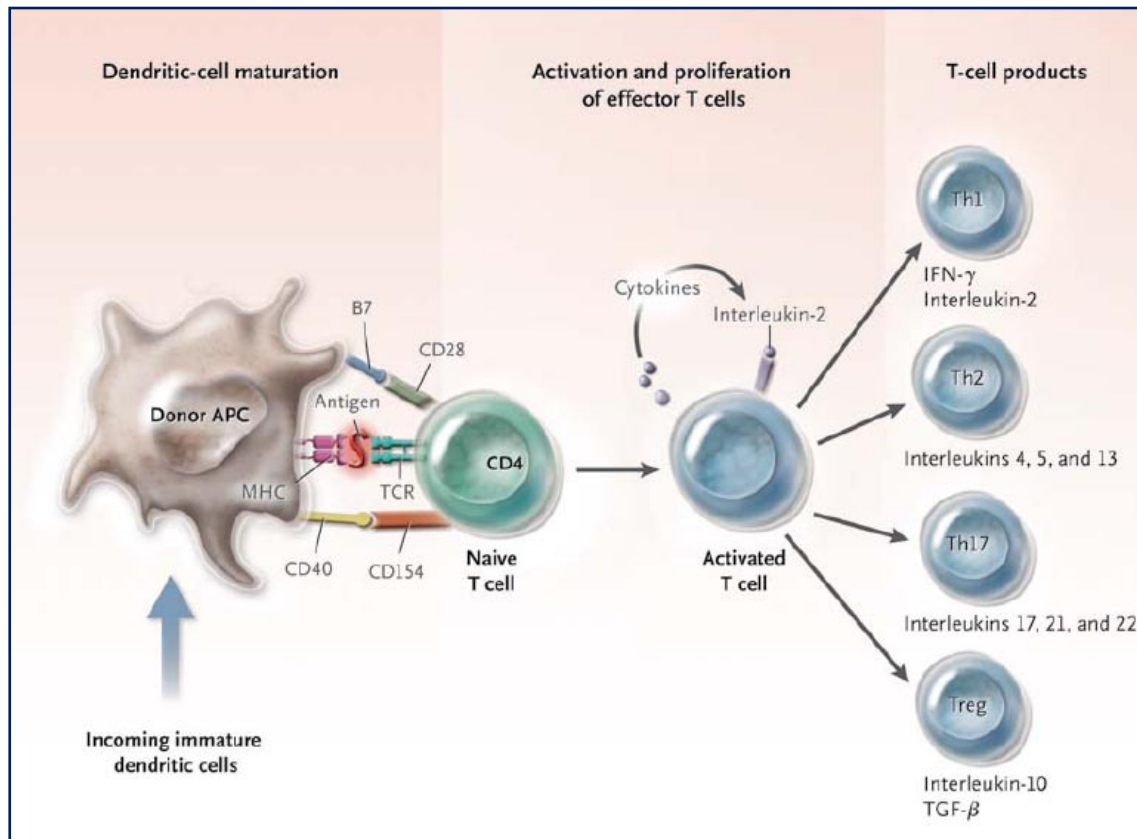


Figura 3. Poblaciones linfocitarias CD4⁺ y citoquinas secretadas.

La activación del receptor T antígeno específico RCT-CD3 no es suficiente para inducir la activación, diferenciación y expansión de la clonal correspondiente. Para ello, se necesita una **segunda señal**, que será proporcionada por varias interacciones moleculares específicas, realizada mediante las llamadas *moléculas de coestimulación*²⁷; entre las más conocidas destacan la unión de CD28 y CD154 (CD40L) del linfocito T a las moléculas del complejo B7 (CD80 y CD86) y CD40 de la CPA, respectivamente. Ésta segunda señal, sólo puede ser proporcionada por algunas células, las llamadas CPA "profesionales". La ausencia de esta segunda señal convertirá al linfocito T en anérgico, es decir incapaz de responder a futuros estímulos, e inducirá su apoptosis celular.



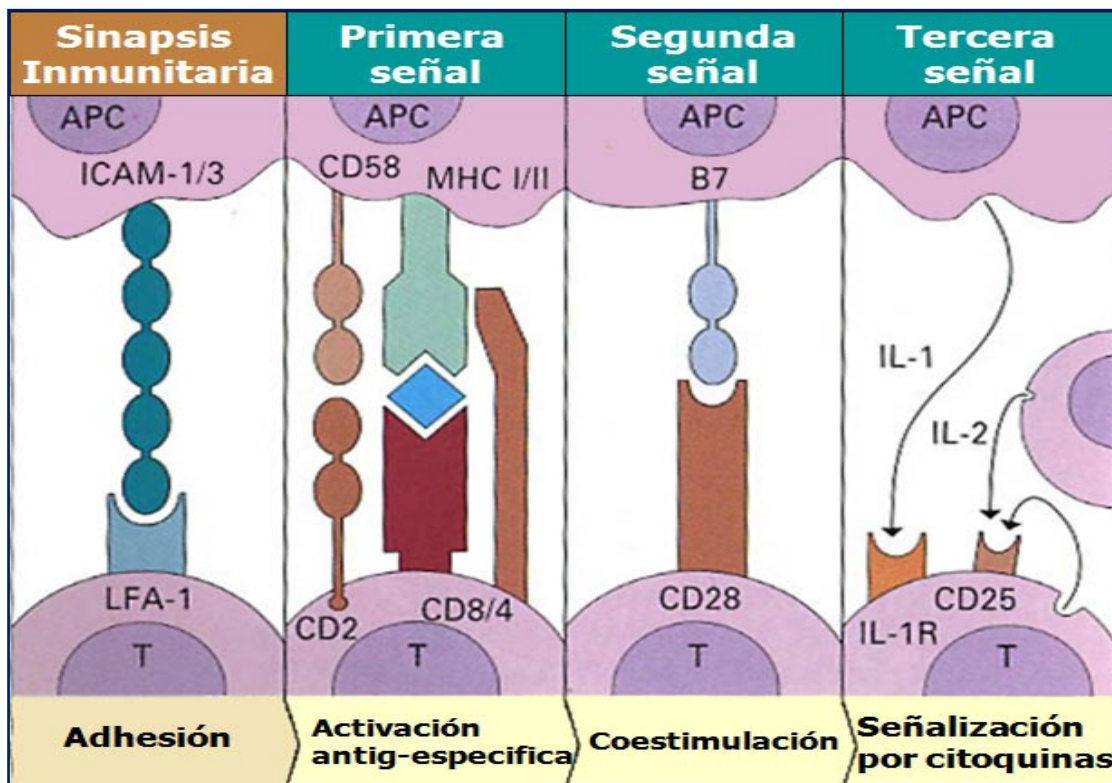


Figura 4. Interacciones necesarias para la activación del linfocito T.

La expresión de receptores específicos de determinadas citoquinas y otras hormonas a nivel local, una vez recibida la señal a través de su RCT, provocará la expansión de los clones de linfocitos T, tanto citotóxicos como colaboradores, específicos para el aloantígeno²⁴. Entre las moléculas más conocidas se encuentra la IL-2 junto a su receptor (IL-2R). Esta, es la denominada **tercera señal** de activación linfocitaria (Figura 4).

III.2.4 La memoria inmunológica celular. Inmunidad heteróloga

Después de una exposición inicial antigénica, los linfocitos T naïve proliferan extensamente y se diferenciarán en linfocitos T efectores capaces de infiltrar tejidos inflamados, y así eliminar los patógenos que han invadido el organismo. Posteriormente, la mayoría de estos linfocitos T efectores sufrirán una muerte celular



por apoptosis, sobreviviendo sin embargo, una subpoblación linfocitaria T de memoria antígeno-específica más resistente a sufrir apoptosis (Figura 5). Esta mayor resistencia a la apoptosis parece ser debida a la presencia de IL-7. En el caso que el individuo vuelva a entrar en contacto con el mismo estímulo antigénico (incluso a menores dosis), la presencia de estos linfocitos T de memoria donante-específicos hará que la respuesta inmunológica sea significativamente más robusta y rápida que la producida tras la primera exposición²⁸.

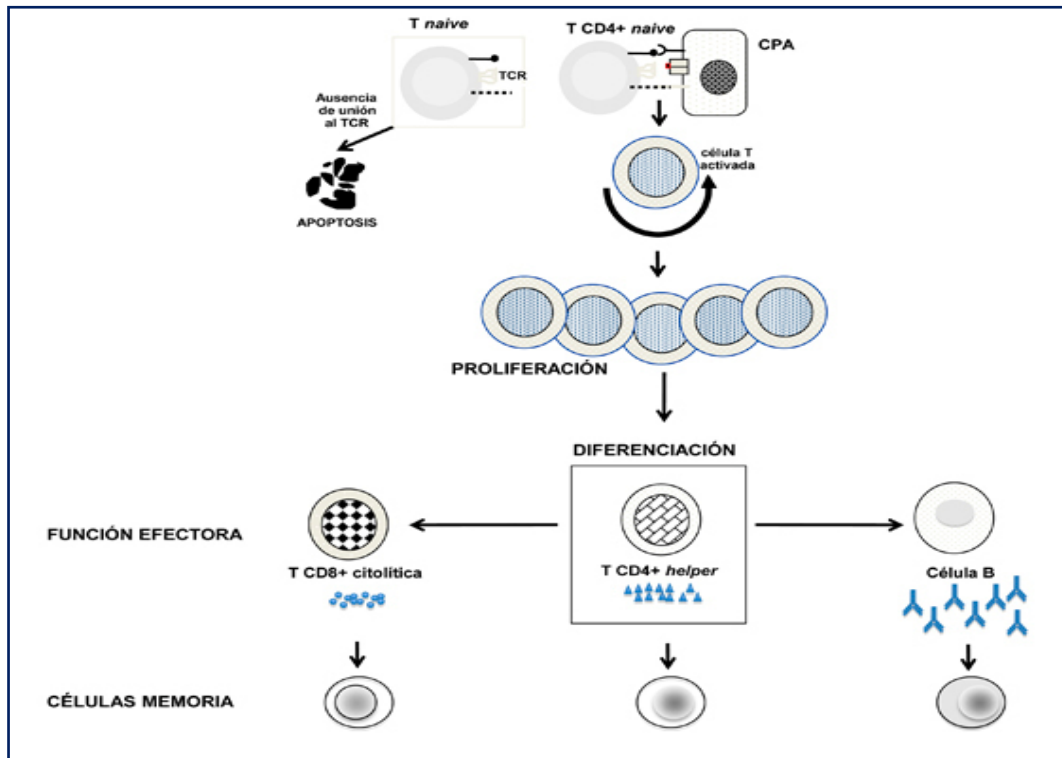


Figura 5. Activación y diferenciación de los linfocitos T CD4+ naïve.

Esta subpoblación linfocitaria de memoria tiene además, la característica de no ser tan dependiente de las señales coestimuladoras (CD28 y CD154), y ser relativamente más resistente a los inmunosupresores convencionales



(anticalcineurínicos, inhibidores de mTOR y micofenolato), diseñados específicamente para bloquear la activación y diferenciación de linfocitos T naïve. Por tanto, la presencia de ésta subpoblación linfocitaria T de memoria donante-específica en los receptores de un trasplante tendrá unas consecuencias deletéreas para la supervivencia del injerto²⁹. Los pacientes con mayor riesgo de presentar ésta subpoblación linfocitaria antes del trasplante son aquellos que han sido politransfundidos, mujeres multíparas o aquellos que han sido trasplantados previamente.

Sin embargo, un número no despreciable de pacientes sin estos antecedentes, desarrolla episodios de rechazo agudo celular con presencia de células T de memoria alorreactivas donanteespecíficas a pesar de no haber estado *a priori* en contacto con antígenos del donante. El *repertorio* de la alorreactividad linfocitaria T en humanos no expuestos previamente a aloantígenos contiene tanto fenotipos naïve como de memoria. Así, la presencia de éstas células de memoria sugiere que éstos linfocitos T alorreactivos han sido activados previamente con ciertos antígenos ambientales (virus, vacunas, entre otros) con características estructurales parecidas a las moléculas HLA³⁰. Éste fenómeno se conoce como reacción cruzada, importante mecanismo dentro de la inmunidad heteróloga. Por tanto, la activación de linfocitos T alorreactivos a través de la inmunidad heteróloga será una importante barrera que se deberá tener en cuenta en el trasplante de órganos.

III.3 Inmunología del rechazo agudo celular y humoral

De la interacción de CPA y linfocitos T en el ganglio linfático resultan células efectoras capaces de atacar el órgano trasplantado por mecanismos tanto celulares como humorales³¹. Los mecanismos celulares efectores son relativamente más sensibles a los inmunosupresores clásicos. En cambio, los humorales aparecen solo en algunos



pacientes y son poco sensibles a estos inmunosupresores. En la práctica, no hay que olvidar que existe una frecuente superposición entre ambos tipos de rechazo. Por ejemplo, la presencia de anticuerpos desencadena una forma de citotoxicidad a través de la activación de las células mononucleares que expresan receptores Fc (porción común de las inmunoglobulinas).

III.3.1 Rechazo celular o mediado por células T

El linfocito CD4⁺ reacciona a la incompatibilidad de clase II (HLA-DR), proliferando y secretando citoquinas proinflamatorias que acentúan a su vez la reacción proliferativa de las células tanto CD4⁺ como CD8⁺. Los precursores del linfocito CD8⁺ citotóxico reaccionan primordialmente frente a los antígenos de clase I (HLA-A y HLA-B) y maduran hasta convertirse en células citotóxicas efectoras. Estos linfocitos T citotóxicos reconocen las células del donante mediante su TCR y las eliminan por citotoxicidad celular directa mediante dos mecanismos distintos (Figura 6):

- 1) La perforina que permeabiliza la membrana celular permitiendo la entrada del Granzima-B.
- 2) La interacción de Fas (CD95) con Fas-Ligando (CD178).

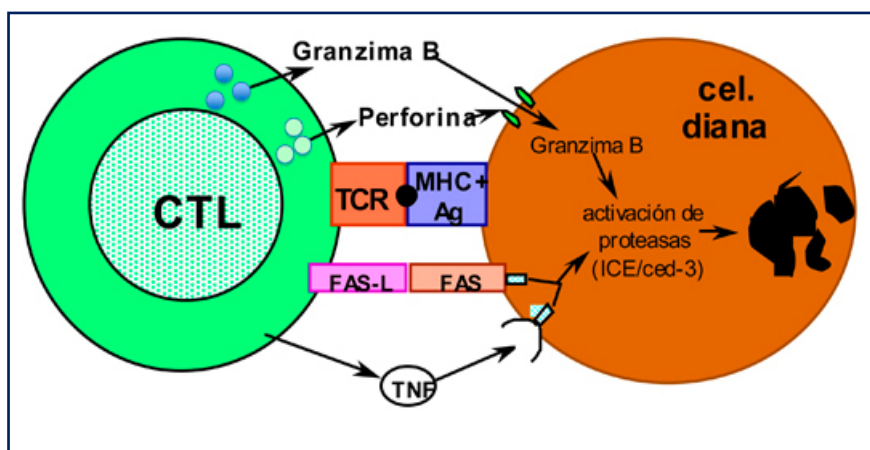


Figura 6. Mecanismos de citotoxicidad directa del linfocito T CD8⁺ (CTL).



Ambos mecanismos activan la apoptosis de la célula diana. Otras células, con receptores para el Fc de las inmunoglobulinas también pueden participar en esta destrucción, mediante la actividad CCDA ("Citotoxicidad Celular Dependiente de Anticuerpo") y posiblemente por actividad citotóxica natural o NK.

Durante el proceso de rechazo, también se encuentran monocitos y linfocitos T secretores de IL-2 e IFN γ . La activación y expansión clonal de los linfocitos CD8⁺ tiene lugar en los ganglios linfáticos gracias a las citoquinas IL-2 e IFN- γ secretadas mayoritariamente por las células Th1 (CD4⁺). Para que los linfocitos migren a través del endotelio y queden retenidos en el injerto, es necesario que el endotelio exprese moléculas de adhesión.

Cuando los linfocitos se activan, disminuye su expresión de L-Selectina, lo que les permite escapar de los territorios linfáticos y recircular por los vasos sanguíneos. Durante el rechazo, INF γ , TNF α e IL1 inducen en el endotelio moléculas que facilitan la adhesión, retención y migración transendotelial de los linfocitos³². Concretamente ICAM-1 (CD54), ligando de LFA-1(CD11a-CD18); V-CAM (CD106), ligando de VLA-4 (CD49d-CD29); E-Selectina (CD62E), ligando de Sialil-Lewis-X y CD31 (PECAM1), molécula que dirige la migración a través del endotelio.

Otro elemento esencial para que los leucocitos migren al parénquima renal son las quimioquinas, pequeños péptidos que controlan la quimiotaxis, es decir, la atracción de neutrófilos, macrófagos, linfocitos T y células NK a determinados territorios. Pero las quimioquinas (MIP-1a/CCL3, RANTES/CCL5, MIG/CXCL9, IP-10/CXCL10, Fraktalkina/CX3CL1, MCP-1/CCL2, etc.) no sólo atraen sino que también activan a los leucocitos. En el rechazo celular histológicamente se observará infiltración túbulo-intersticial por linfocitos T efectores, pudiéndose también hallar a nivel del endotelio y



pared vascular según el grado de rechazo que se presente. En este caso no habrá depósitos de anticuerpos ni de moléculas derivadas de la activación de la cascada del complemento como el C4d.

III.3.2 Rechazo humoral o mediado por anticuerpos

El rechazo hiperagudo mediado por anticuerpos es poco frecuente gracias a que podemos predecirlo antes del trasplante mediante la realización de una prueba cruzada o “crossmatch” entre los linfocitos del donante y el suero del receptor. La presencia en el receptor de anticuerpos donantespecíficos pre-trasplante condiciona una respuesta inmunitaria con activación del complemento, destrucción del endotelio y trombosis generalizada del injerto en las primeras 24 horas, o incluso, minutos después del trasplante (Figura 7)³³.

El rechazo humoral provocado por anticuerpos *de novo*, es decir aparecidos después del trasplante, es más frecuente de lo que anteriormente se creía. Quizá el hecho de que los inmunosupresores sean cada vez más eficaces en el control del rechazo celular hace que el rechazo por anticuerpos tenga hoy una mayor incidencia relativa.

Este rechazo se caracteriza por la presencia de anticuerpos donante específicos circulantes (ADEs) y por la presencia de polimorfonucleares y depósitos de C4d en los capilares peritubulares renales. Los depósitos de C4d simplemente constituyen un testimonio duradero de que allí se ha producido una activación del complemento. Los anticuerpos pueden ser frente antígenos HLA de clase I, de clase II o frente otro tipo de antígenos (endoteliales, tubulares, etc.).

Las células endoteliales poseen en su membrana heparan sulfato y otras moléculas, que le confieren una carga negativa. Ello les permite repeler moléculas de carga negativa, tales como proteínas y factores de la coagulación. Pero si se lesionan, en



este caso por la activación del complemento, liberan heparan-sulfato y pierden su electronegatividad. Además, las células endoteliales lesionadas segregan citoquinas (IL1 α , IL8), quimioquinas (CCL2), P-selectinas y factor de von Willebrand que promueven la agregación plaquetaria. La activación del complemento por su vía clásica, forma factores de actividad quimiotáctica (C3b y C5a) que como CCL2, atraen leucocitos a los capilares glomerulares y peritubulares. Además, las células necrosadas dejan espacios intercelulares por los que la matriz subendotelial se expone a factores de la coagulación y a plaquetas que provocan trombosis vascular.

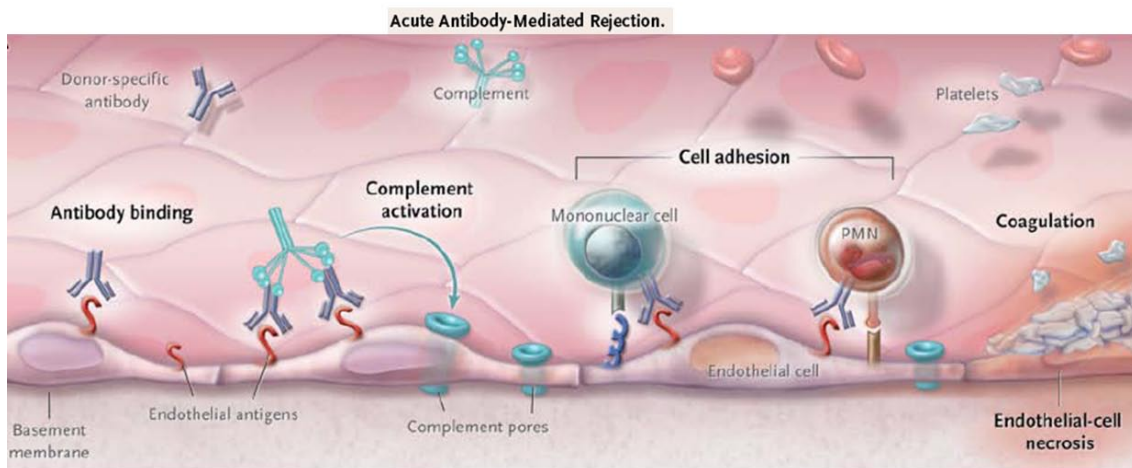


Figura 7. Mecanismos del rechazo agudo humoral.

III.4 Mecanismos de tolerancia inmunológica

Desde la primera demostración de adquisición del principio de tolerancia descrita en el año 1961 por Sir Peter Medawar^{34, 35}, muchos otros investigadores han podido reproducirla siempre en condiciones experimentales, tanto en roedores como en cerdos, perros e incluso en primates no humanos. Sin embargo, en humanos el estado de tolerancia ha sido objetivado en algunos casos pero su ocurrencia es todavía incierta.

La definición clínica de tolerancia viene dada por el mantenimiento de la función del injerto sin requerimiento inmunosupresor de forma crónica. Este escenario



se manifiesta a través de una serie de procesos inmunológicos simultáneos, entre los que se incluyen la modulación en la frecuencia de los precursores celulares efectores, la eficiencia presentadora antigénica, el umbral de activación de las células efectoras, regulación y la alteración en el proceso de migración celular. De ahí que el estado de tolerancia pueda alcanzarse potencialmente a través de varios mecanismos³⁶.

Uno de los principales inconvenientes viene dado por la intrínseca naturaleza de la inmunidad adaptativa. Así, el fenómeno derivado de la inmunidad heteróloga, es decir la reacción cruzada a antígenos ambientales en cualquier momento tendrá capacidad de evocar una respuesta frente a aloantígenos y por tanto abortar un estado de hiporrespuesta donante-específica.

Los índices de rechazo y supervivencia clínica del injerto sugieren que el hígado tiene más susceptibilidad a ser tolerado que otros órganos sólidos como el riñón, corazón o páncreas. Ello parece ser debido a sus diferentes grados de inmunogenicidad, como la diferente densidad de expresión de moléculas HLA y la diferente capacidad presentadora de las CPA presentes.

Las estrategias para inducir tolerancia se han basado esencialmente en intentar modificar la fuente antigénica y, por tanto, modulando la respuesta inmune de forma dirigida, básicamente a través de la utilización de progenitores hematopoyéticos. Las estrategias utilizadas con el uso de células hematopoyéticas son básicamente dos, bien para inducir la apoptosis de células efectoras activadas (la denominada “activated-induced cell death”), siendo éste un mecanismo periférico (independiente del timo), ya que las células hematopoyéticas administradas actuarían como cebo antigénico para ser eliminadas, promoviendo una alorrespuesta efectora que evitaría que la parte más fuerte del ataque fuera contra el órgano trasplantado. La otra, se basaría en la incorporación



propiamente de éstas células a nivel de los órganos linfoides centrales, es decir el trasplante de médula ósea de precursores hematopoyéticos del mismo donante, influyendo así en el desarrollo del repertorio antigénico a nivel central (*macroquimerismo*).

Idealmente, el logro de un quimerismo completo comportaría la mejor condición para lograr la tolerancia del injerto. Sin embargo, la significativa mortalidad asociada al trasplante de médula hace que este procedimiento sea realmente posible en un número muy reducido de casos, ya que la mortalidad asociada sobrepasa el riesgo que conlleva el tratamiento inmunosupresor convencional. Por ello, se está desarrollando en la actualidad el *quimerismo mixto*, en el que ambos componentes celulares del receptor y donante coexisten, evitando así un régimen mieloablativo completo. Evitando el rechazo de los precursores celulares del donante, éstos repueblan el timo y médula ósea del receptor facilitando la delección central de linfocitos T y B aloreactivos. Se han publicado datos muy prometedores aunque todavía con muy pocos casos.

Otras estrategias se han centrado en intentar facilitar la delección clonal o anergia celular, mediante el bloqueo de la segunda señal de activación linfocitaria o de coestimulación (Figura 8). Tal y como se ha expuesto anteriormente, tras el contacto antigénico el linfocito T en ausencia de segunda señal coestimuladora sufre un proceso de anergia o apoptosis³⁷. Así, el bloqueo de la coestimulación ha sido usado en robustos modelos preclínicos para facilitar mecanismos protolerogénicos.



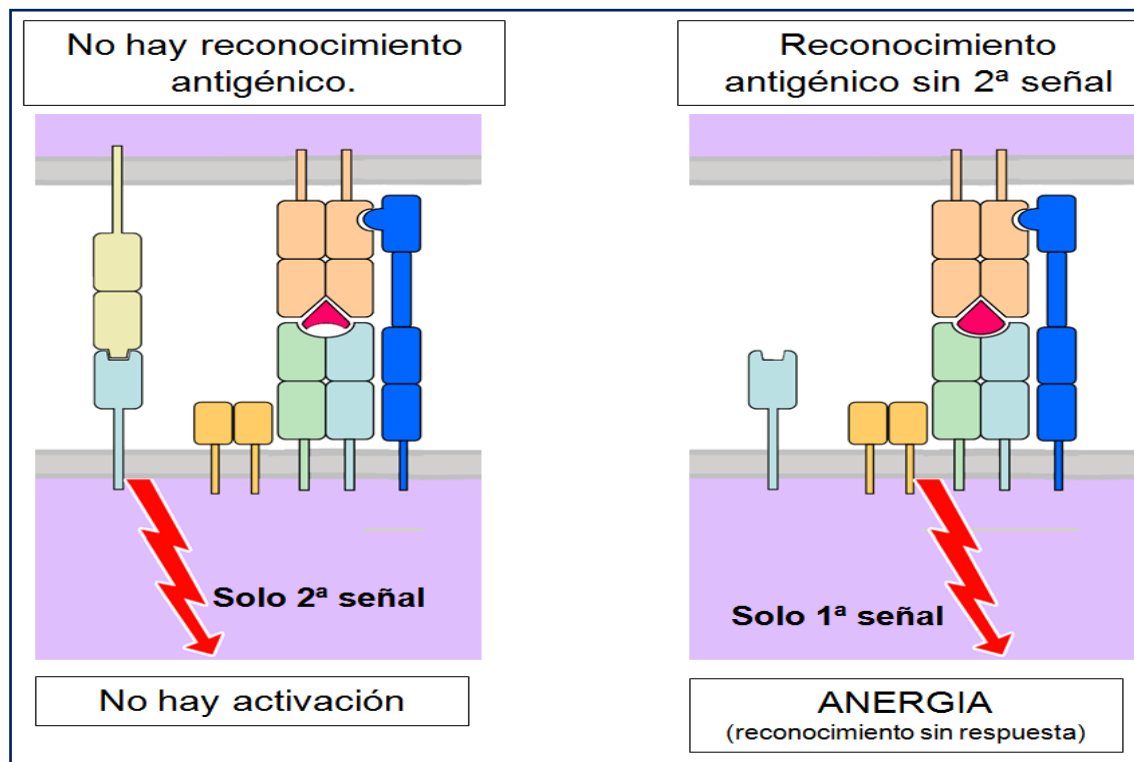


Figura 8. Mecanismos de bloqueo de la activación linfocitaria.

En los últimos años, otra estrategia que va adquiriendo cada vez más importancia es la de intentar potenciar la expansión de células T reguladoras (Tregs). Éstas células son linfocitos esencialmente CD4⁺ con elevada expresión del receptor de IL-2 (CD4⁺ CD25^{high}) con capacidad supresora de alorrespuesta donante específica, siendo su rol de gran relevancia tanto por su capacidad inductora como de mantenimiento del estado de hiporrespuesta donante específica³⁸. Su característica fenotípica principal es la de tener el factor de transcripción Foxp3⁺, gen responsable de su actividad reguladora. Estas células pueden ser de aparición natural, es decir generadas a nivel tímico, o bien ser inducidas en la periferia tras el reconocimiento antigénico, condición *sine qua non* para explicar su efecto donante específico y en el seno de un ambiente rico en citoquinas IL-10 y TGF- β (Figura 9). Trabajos experimentales muestran como la transferencia adoptiva de esta subpoblación linfocitaria con especificidad donante-específica previene del desarrollo tanto de rechazo agudo como crónico del injerto.



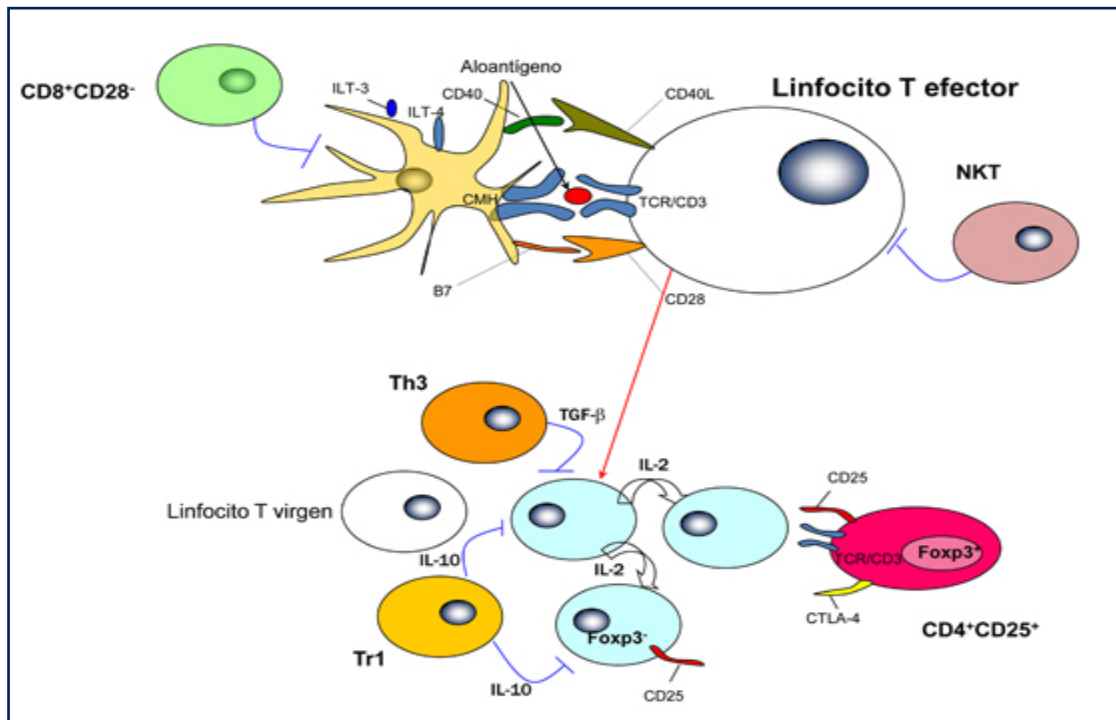


Figura 9. Diferencias fenotípicas y funcionales de las células Tregs.

III.5 Respuesta inmune en la isquemia-reperfusión

III.5.1 Lesión endotelial

Las células endoteliales y del músculo liso vascular juegan un papel crítico en la fisiopatología de la lesión renal aguda secundaria al proceso de isquemia-reperfusión^{39, 40}. El flujo de sangre a nivel de la región medular externa se reduce de manera desproporcionada a la reducción en la perfusión renal total después de una lesión isquémica⁴¹. Las células endoteliales son determinantes del tono vascular, la función leucocitaria y la respuesta del músculo liso⁴². El endotelio es dañado y las arteriolas sufren una importante vasoconstricción en respuesta al aumento de los niveles tisulares de endotelina-1, angiotensina II, tromboxano A2, prostaglandina H2, leucotrienos C4 y D4 y adenosina, así como a la estimulación del sistema nervioso simpático. Esta vasoconstricción es mayor debido a una producción reducida de óxido



nítrico y otras sustancias vasoconstrictoras por parte de la célula endotelial dañada. Estos efectos a nivel arteriolar se amplifican por la acción de distintas citoquinas, entre las que se incluyen $TNF\alpha$, $IL1\beta$, $IL6$, $IL12$, $IL15$, $IL18$ e $IL32$, que son generadas como resultado de un incremento en la adhesión y activación leucocitaria, ambos característicos de la lesión isquémica^{43, 44}.

El incremento en la vasoconstricción, junto con la oclusión de los vasos debido a las interacciones de los leucocitos con el endotelio y a la activación del sistema de la coagulación, provoca un compromiso local de la microcirculación, con isquemia regional especialmente en la región medular externa. La célula endotelial contribuye a la patología de la lesión isquémica en muchos aspectos⁴⁵. La mejoría en la interacción del endotelio con los leucocitos se debe a un aumento de expresión de moléculas de adhesión tales como ICAM-1 por parte de las células endoteliales y de las integrinas por los leucocitos. Esto da lugar a la obstrucción de capilares y vénulas postcapilares, la activación adicional y migración de leucocitos, la producción de citoquinas y un estado proinflamatorio marcado. El endotelio dañado sufre una pérdida del glucocáliz, con interrupción del citoesqueleto de actina y la degradación de la matriz perivascular. Todo ello culminará con un aumento de la permeabilidad microvascular y la pérdida de líquido hacia el intersticio (Figura 10). Con la reperusión, también se observa un compromiso transitorio parcial de la permeabilidad de los capilares peritubulares.



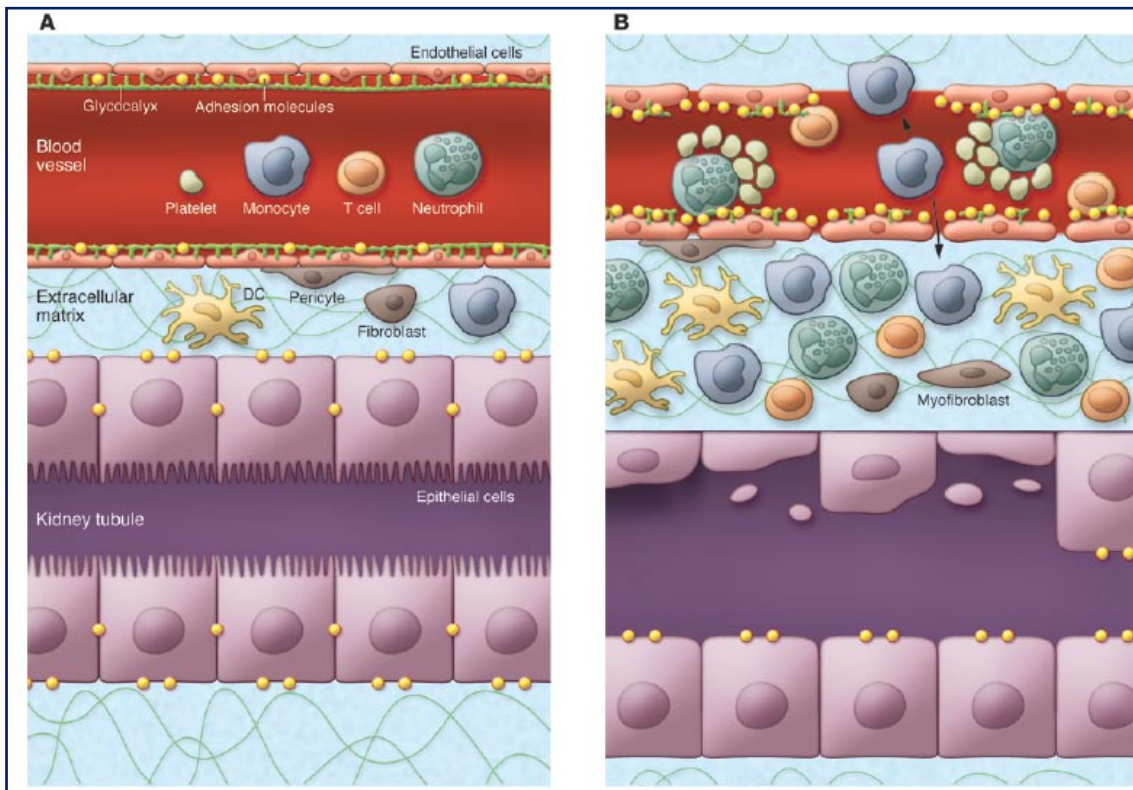


Figura 10. Lesión endotelial por isquemia-reperfusión. (A) Epitelio y endotelio normal. (B) Epitelio dañado, con lesión del glucocáliz e infiltración leucocitaria.

El número de microvasos en la banda interna de la región medular externa disminuye después de la lesión por isquemia reperfusión, potencialmente facilitado por la regulación a la baja de factores de angiogénicos como el VEGF y la regulación positiva de inhibidores de la angiogénesis⁴⁶. Este número reducido de vasos está asociado con la hipoxia crónica, que acaba provocando el desarrollo de atrofia tubular y fibrosis intersticial. Dicha fibrosis compromete aún más la microvasculatura y disminuye la disponibilidad de oxígeno y nutrientes a los túbulos, interfiriendo en los procesos regenerativos y conduciendo a una mayor fibrosis. Los vasos sanguíneos restantes también pueden tener el flujo sanguíneo disminuido por el edema de las células endoteliales.



III.5.2 Respuesta inmune

Tanto la respuesta inmune innata como la adaptativa juegan un papel importante en la fisiopatología de la lesión isquémica. El componente innato es responsable de la respuesta temprana a lesiones de una manera no antígeno-específica y está formado por neutrófilos, células dendríticas, monocitos, macrófagos, células NK y las proteínas del complemento. El componente adaptativo, activado por antígenos específicos, se inicia en cuestión de horas y dura hasta varios días. La respuesta adaptativa incluye la maduración de células dendríticas y la presentación de antígenos, la activación y proliferación de linfocitos T y la interacción entre linfocitos T y B.

Las células tubulares contribuyen a la inflamación, de tal forma que el epitelio tubular no es meramente una víctima pasiva de la lesión, sino también un participante activo en la respuesta inflamatoria. Las células lesionadas y muertas por isquemia, liberan material intracelular que estimula la respuesta inmune innata. A este material se lo conoce como “patrones moleculares asociados al daño celular” (DAMPs) y está formado por proteínas del shock y de la matriz extracelular (fragmentos de ácido hialurónico, proteoglicanos y fibronectina), ácido úrico, DNA y RNA que son ligandos de los receptores tipo Toll (TLRs) y de los de reconocimiento patrón del citosol (receptores de proteínas dominio-oligomerización de unión a nucleótidos - NLRs) (Figura 11).



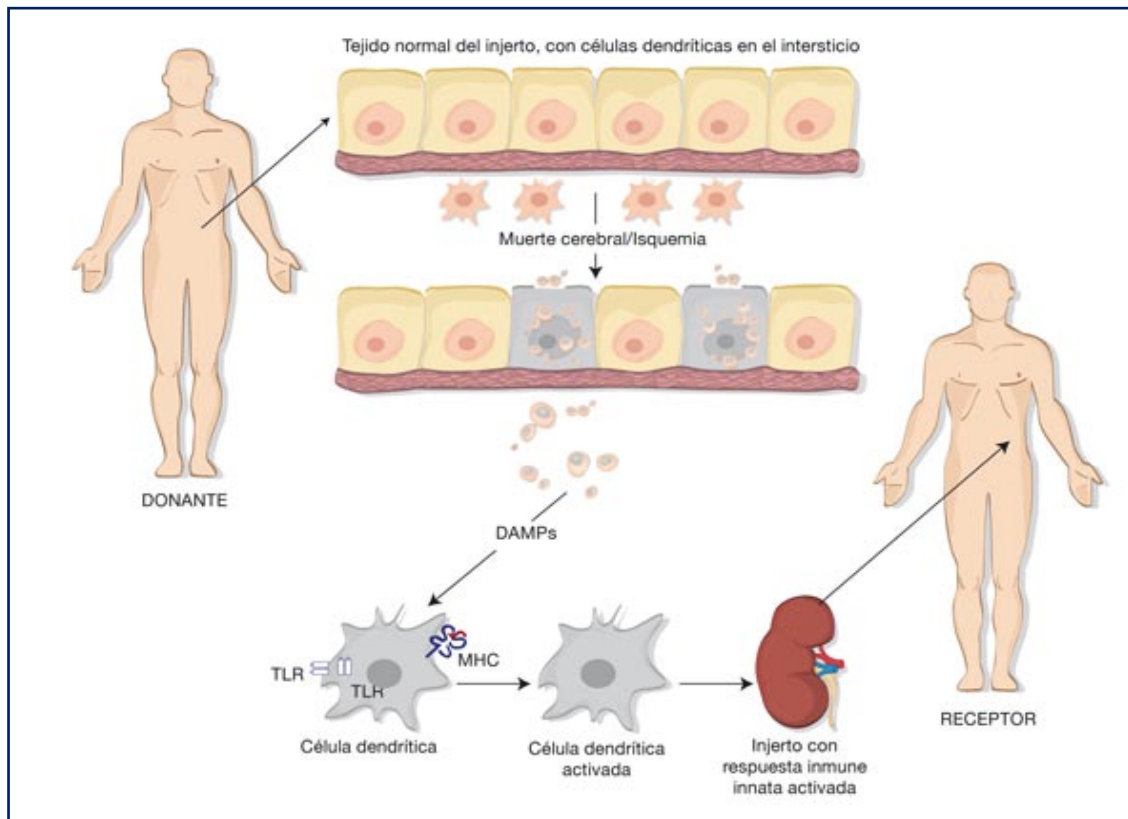


Figura 11. Células del injerto lesionadas por efecto de la isquemia y liberación del material intracelular al medio (DAMPs), que estimula la respuesta innata.

Las células epiteliales, endoteliales y mesenquimales del injerto, poseen ambos tipos de receptores, especialmente los TLR2 y TLR4. Una vez estimulados por sus ligandos, son el punto de partida de una vía de señales bioquímicas que activan la respuesta inmune innata, incluida la producción de citoquinas, tales como $\text{TNF}\alpha$, MCP1, IL8, IL6, IL1 β , TGF β , RANTES, y neutrophil-epitelial proteína activadora de 78 (ENA78) y la expresión de moléculas coestimuladoras, que regulan la actividad de los linfocitos T⁴³.

Los órganos procedentes de donantes con muerte cerebral, muestran una mayor expresión de TLRs, que los de donante vivo. Estudios experimentales, han demostrado que mutaciones de TLR4 con menor afinidad para los ligandos DAMPs, reducen la respuesta inflamatoria en el órgano y la incidencia de función retrasada del injerto.



Además de su papel en la generación de mediadores que contribuyen a la respuesta inflamatoria, el epitelio tubular proximal expresa moléculas de HLA de clase II y por lo tanto pueden presentar antígenos a las células T. Las células del túbulo proximal responden a ligandos de las células T mediante la activación de receptores de superficie celular. La isquemia-reperfusión aumenta la expresión de B7-1 y B7-2, moléculas coestimuladoras de células del túbulo que interactúan con CD28 de los linfocitos T y facilita la producción de citoquinas^{47, 48}.

Entre las células del sistema inmune, *los neutrófilos* y los monocitos-macrófagos especialmente, juegan un papel crucial en la lesión isquémica y de reparación. Los neutrófilos atacan y se adhieren al endotelio activado a los 30 minutos de la perfusión y se acumulan en el riñón tanto en modelos animales como humanos⁴⁹, en particular en la red capilares peritubulares de la médula externa. Producen proteasas, mieloperoxidasa, radicales libres de oxígeno y citoquinas, que conducen a un aumento de la permeabilidad vascular y a una pérdida de la integridad de las células endoteliales y del epitelio tubular, agravando la lesión renal. IL- 17 producida por los neutrófilos regula la migración de éstos, mediada a su vez por IFN γ ⁵⁰.

Con respecto a *los monocitos*, se han identificado dos tipos tras el proceso de isquemia-reperfusión en ratones: aquellos que migran a los tejidos no lesionados rápidamente al salir de la médula ósea y se diferencian en macrófagos residentes y células dendríticas (M2) y un segundo subconjunto de monocitos (M1), que infiltran el tejido renal inflamado. La migración hacia el tejido y la diferenciación en macrófago residente (M2), macrófago "inflamado" (M1) o célula dendrítica se determina por diferentes condiciones patológicas y de señalización. Los macrófagos M1 producen grandes cantidades de radicales de oxígeno y citoquinas inflamatorias (incluyendo IL1 β y TNF α) que impulsan una respuesta inmune Th1 polarizada. Los M2 se cree que son



"pro-reparadores" y son generados cuando los monocitos se exponen a IL4 o IL13, IL10 y hormonas glucocorticoides. Los macrófagos M2 provocan principalmente una respuesta Th2⁵¹.

En la lesión por isquemia-reperfusión, tanto en sus fases tempranas como tardías, la infiltración por *linfocitos T*, al igual que los macrófagos y las células dendríticas, puede no solo favorecer la lesión, sino también promover la reparación. Las células CD4+, en presencia de la coestimulación con CD28, se han implicado en la potenciación de la lesión⁵². Por el contrario, las células T reguladoras (Tregs) tienen propiedades antiinflamatorias y facilitan la reparación⁵³.

III.6 Papel de las citoquinas y su codificación genética

III.6.1 Factor de Necrosis Tumoral α (TNF α)

El TNF α es producido por células T, NK y macrófagos. Promueve la inflamación, mediante la activación de las células endoteliales vasculares, que expresan moléculas de adhesión que, a su vez, incrementan la permeabilidad capilar y participan en el reclutamiento leucocitario. También incrementa la expresión de las moléculas de HLA de clase I. Es un coestimulador de la activación de células T y de la producción de anticuerpos por células B⁵⁴. Su secreción es inhibida por IL6 y TGF- β .

El gen de TNF α es uno de los tres genes homólogos que componen la familia del TNF y está ubicado en el cromosoma 6, región 6p21.3. La linfotoxina- α (LT- α o también llamada TNF- β) y la linfotoxina- β (LT- β) completan el resto del conjunto y los tres genes se localizan dentro de la misma región de clase III del HLA, estando



estrechamente ligados entre sí (Figura 12). Pertenecen a la misma superfamilia que CD40L y Fas, presentado homología entre ellas.

Este gen es regulado a nivel transcripcional y postranscripcional y ciertas variaciones en su región promotora pueden favorecer un cambio en la síntesis de esta proteína. Hay autores que afirman que hasta un 60% de la variación en la producción de TNF α está determinada genéticamente⁵⁵. El SNP -308 G/A (rs3093662) es el más conocido y ampliamente documentado. La presencia del alelo A (AA o AG) se ha asociado con un incremento de la actividad transcripcional⁵⁶ y elevada producción in vitro de TNF- α ⁵⁷.

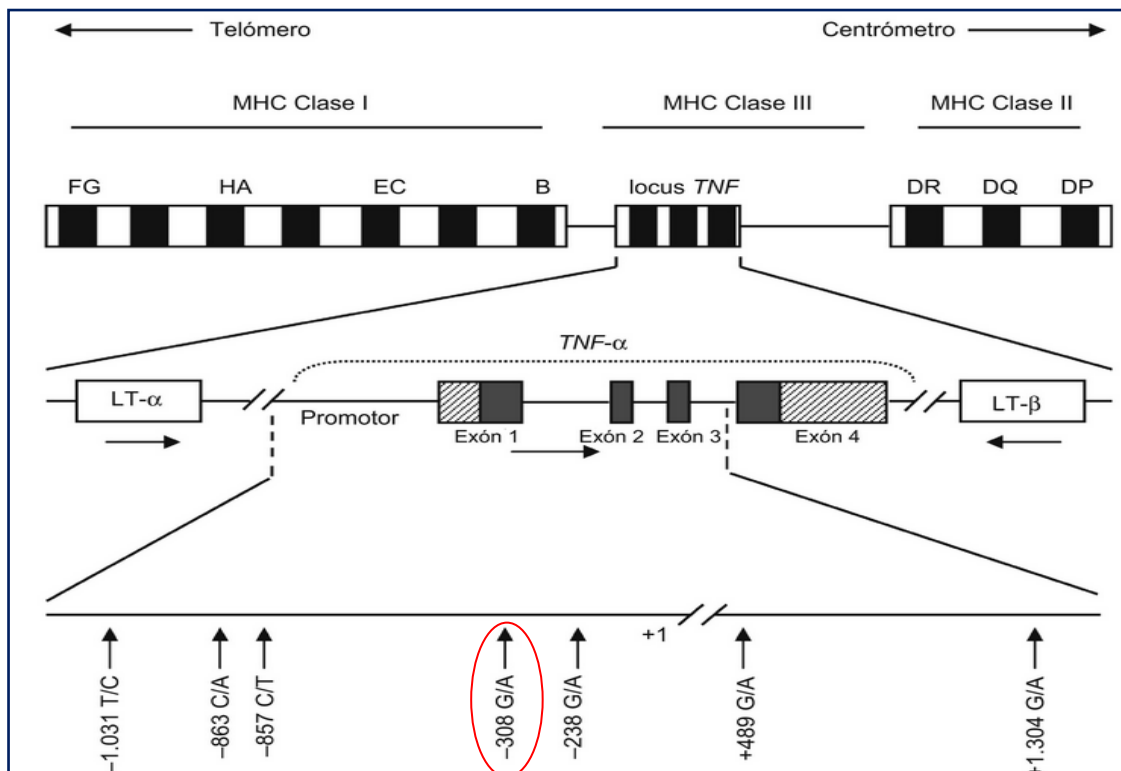


Figura 12. Representación esquemática del gen del TNF α , con los SNPs más relevantes.



El $\text{TNF}\alpha$, al igual que otras citoquinas proinflamatorias secretadas por macrófagos activados, como IL1, IL12, IL18 e $\text{IFN}\gamma$, pueden perjudicar la función del injerto e intensificar el rechazo mediado por células T^{58} . Por tanto, polimorfismos que alteren su producción podrían influir en los resultados del trasplante.

III.6.2 Interleuquina 18 (IL18)

Es un miembro de la familia de las IL1 y previamente fue conocida como un factor inductor del $\text{IFN}\gamma$. Se trata de una citoquina pro-inflamatoria, que juega un papel clave en la regulación de la alorrespuesta inmune y la defensa del huésped frente a infecciones. Su gen está situado en la región 11q22.2-22.3, muy próximo al locus D2 del receptor de la dopamina. Esta proteína es secretada principalmente por macrófagos, pero también por células osteoblásticas, epiteliales intestinales, condrocitos y epiteliales de los túbulos renales^{59, 60}. Se secreta en su forma inactiva (pro-IL18) y es convertida a la forma activa a través de la caspasa-1. Su principal función es la de maduración de las células T y NK, de forma sinérgica con la IL12. Además promueve la producción de citoquinas Th1, especialmente $\text{IFN}\gamma$ y $\text{TNF}\alpha$, y la activación de linfocitos T citotóxicos (Figura 13).

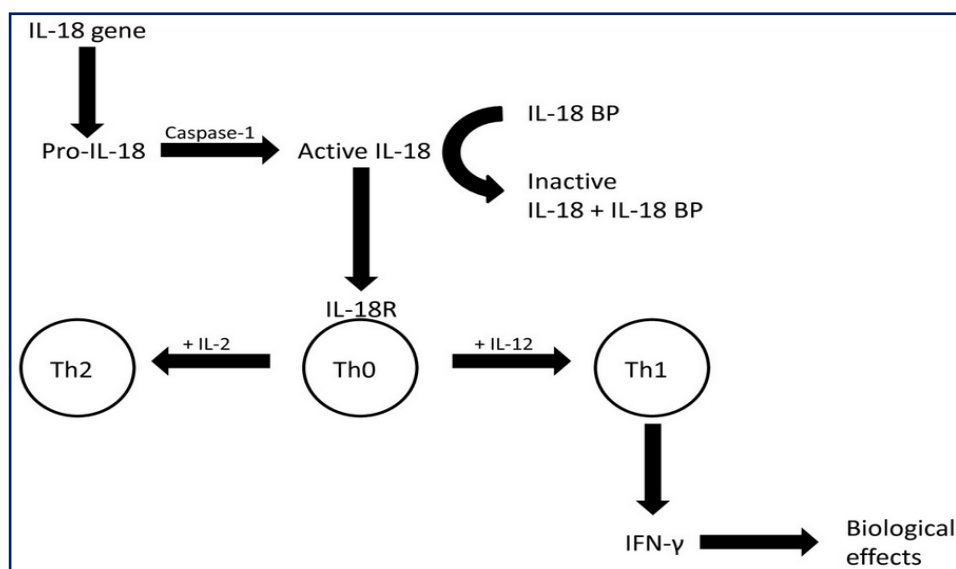


Figura 13. Regulación y efectos biológicos de la IL18.



La región promotora del gen de la IL18 contiene lugares de unión para diferentes factores de transcripción como el factor nuclear κ B (NF κ B) y el traductor de la señal y activador de la transcripción-5. Por otro lado, la proteína de unión de IL18 o IL18 binding protein es la responsable de la regulación negativa de la expresión de IL18.

Se han identificado 3 SNPs en la región promotora: -656 G/T, -607 C/A, - 137 G/C y 2 a nivel del intrón: +113 T/G, +127 C/T; sin embargo, solo dos de ellas tienen relevancia funcional. Un cambio de C por A en la posición -607 (rs1946518) tiene como resultado un fallo de unión con la proteína de respuesta a AMP cíclico, mientras que una sustitución en la posición -137 de G por C (rs187238) influye en la unión con el factor nuclear H4TF-1. Sujetos homocigotos para -607C y -137G expresan niveles más elevados de IL1⁶¹.

Estudios previos han demostrado que pacientes con rechazo agudo muestran niveles más elevados de IL18, no solo por un aumento de la síntesis por las células del sistema inmune, sino también por las propias células del epitelio tubular renal⁶⁰, como se ha mencionado anteriormente.

III.6.3 Interferony (IFN γ)

Producido por células T y NK, activa a macrófagos, células endoteliales y neutrófilos. Incrementa la expresión de las moléculas de HLA de clase II, promueve la diferenciación Th1 y suprime la respuesta Th2. Activa el endotelio para promover la adhesión de los linfocitos T CD4 y es necesario para la activación de los linfocitos T CD8.



El gen del IFN γ se encuentra localizado en el cromosoma 12q24.1. El SNP +874 A/T (rs2430561) se sitúa en el lugar de unión de NF κ B, en el primer intrón del gen y está implicado en el control de los niveles de producción de IFN γ ^{62, 63}.

Varios estudios han mostrado una asociación entre los niveles de IFN γ y la susceptibilidad a enfermedades autoinmunes, infecciones u otras situaciones en las que el sistema inmune juega un papel clave. Se postula que variaciones genéticas que conlleven una alteración en la producción de IFN γ , pueden influenciar el curso de la enfermedad, más que ser un gen causante de enfermedad⁶⁴.

III.6.4 Interleuquina 10 (IL10)

Citoquina anti-inflamatoria y con funciones inmunomoduladoras, producida principalmente por monocitos y células Th2 y Tregs. Inhibe la presentación del antígeno por macrófagos y la producción de citoquinas pro-inflamatorias, como IL1, IL6, IL8, IL12 y TNF α (Figura 14). Además disminuye la expresión de moléculas de HLA de clase II y de moléculas de adhesión. También se ha descrito un efecto inhibitorio de la IL10 sobre moléculas implicadas en la coestimulación (B7-1/B7-2). Todo ello indica que la IL10 puede jugar un papel clave en la tolerancia del injerto.

Sin embargo, a la vez que inhibe la respuesta inflamatoria, es capaz de activar a los linfocitos B e inducir la secreción de inmunoglobulinas. Además, puede potenciar la expresión de IL-15 en macrófagos murinos activados, lo cual de acuerdo a su efecto regulador negativo sobre IL-2 sugiere un soporte paradójico para la respuesta inmune mediada por células, de ahí la alta complejidad de su función en la regulación del sistema inmune⁶⁵.



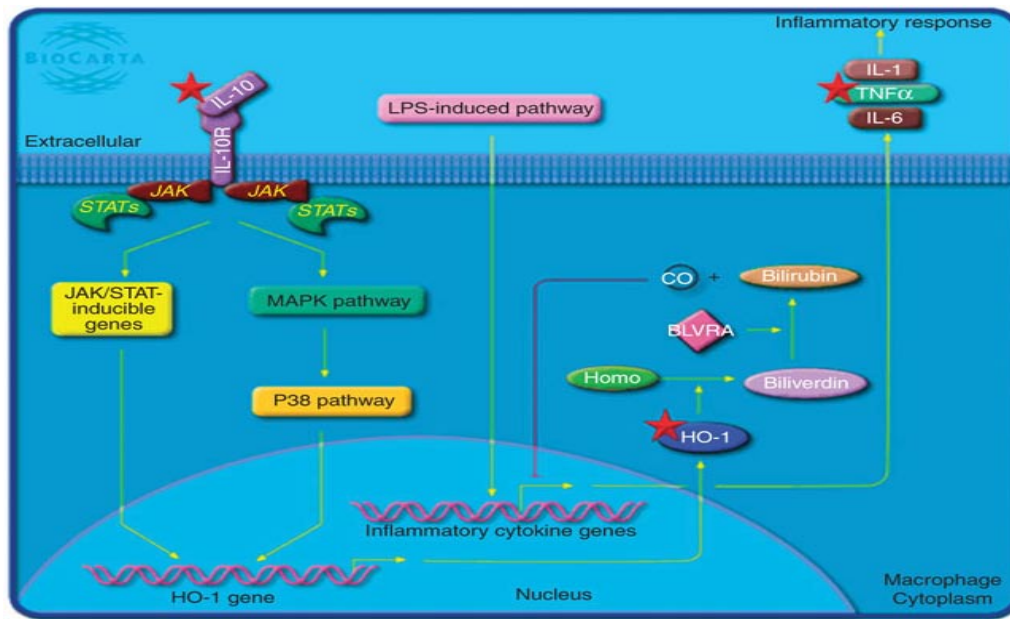


Figura 14. Lugar y mecanismo de acción de la IL10. Vías de señalización.

El gen que codifica la IL10 se localiza en el cromosoma 1q31-32 y comprende 5 exones. La región promotora contiene varios SNPs que influyen en la expresión y funcionalidad de la IL10 (Figura 15). Los más conocidos son: -1082 G/A (rs1800896), -819 C/T (rs1800871), -592 C/A (rs1800872), de tal forma que el haplotipo GCC es el que se asocia con mayor producción de IL10 tanto in vitro como in vivo⁶⁶⁻⁶⁸.

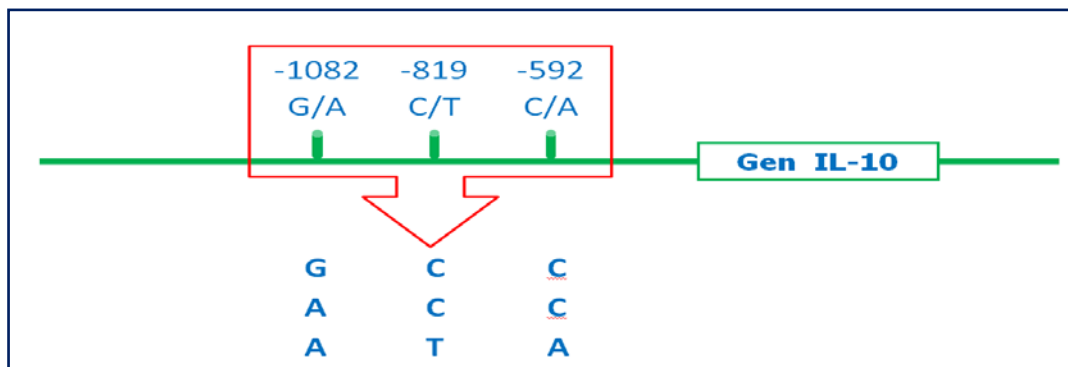
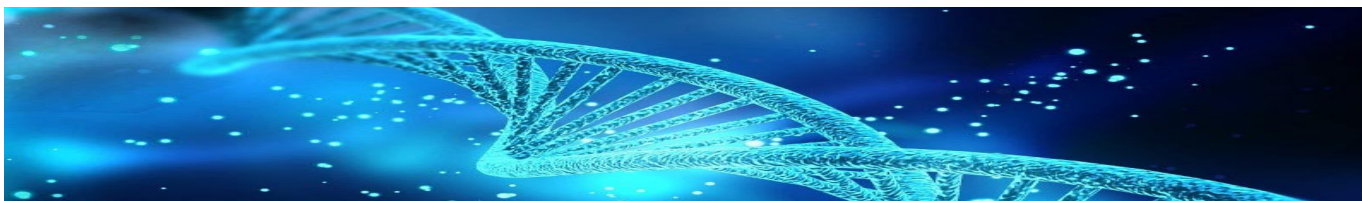


Figura 15. SNPs de la región promotora de la IL10.



IV JUSTIFICACION



A pesar de la existencia de similares características clínicas y demográficas y la aplicación de idénticos protocolos de inmunosupresión, la incidencia de RA en pacientes que reciben un trasplante renal varía ampliamente. La respuesta inmune celular y humoral que se genera cuando tiene lugar un RA está modulada por una intrincada red de señales moleculares, donde están especialmente implicadas distintas citoquinas y quimioquinas del organismo. La expresión y regulación genética de estas citoquinas pueden modificar la respuesta ante un mismo estímulo. Se ha descrito que variaciones en la región promotora o codificadora de un gen clave que regule la síntesis de determinadas proteínas, pueden modificar su estructura y regular su producción. Estas modificaciones pueden tener consecuencias a nivel de la alorrespuesta inmune. Sin embargo, la influencia de estos polimorfismos en los resultados del trasplante renal sigue siendo motivo de gran controversia.

De entre todos los polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs de inglés Single Nucleotide Polymorphism) conocidos que modifican la producción de distintas citoquinas, hemos seleccionados por su mayor relevancia en la respuesta inmune y su más amplio conocimiento, los siguientes: IL10 -1082G/-819C/-592C, TNF α -308A, INF γ +874T, IL18 -607C/-137G.

La búsqueda de asociación de estos SNPs con los resultados del trasplante renal puede ser de gran utilidad, ya que nos puede aportar mayor información para realizar una estratificación pretrasplante más adecuada del paciente según su riesgo inmunológico. En concordancia con estos datos, podríamos individualizar los protocolos de inmunosupresión, de forma que combatiéramos eficazmente el rechazo, pero minimizando efectos secundarios y posibles complicaciones infecciosas, el gran reto de la mayoría de los equipos de trasplante hoy en día.



V HIPOTESIS Y OBJETIVOS



V.1 HIPOTESIS

Los SNPs de las citoquinas proinflamatorias (TNF α , INF γ e IL18) son un factor de riesgo de al menos el doble de RAV, mientras que el SNP de IL10, que es una citoquina antiinflamatoria, supone una reducción de riesgo del al menos el 50%.

V.2 OBJETIVO PRINCIPAL

Evaluar la influencia de los SNPs estudiados (variables independientes) en los resultados del trasplante renal, valorando su impacto en la incidencia de RAV, FRR y supervivencia del injerto (variables dependientes).

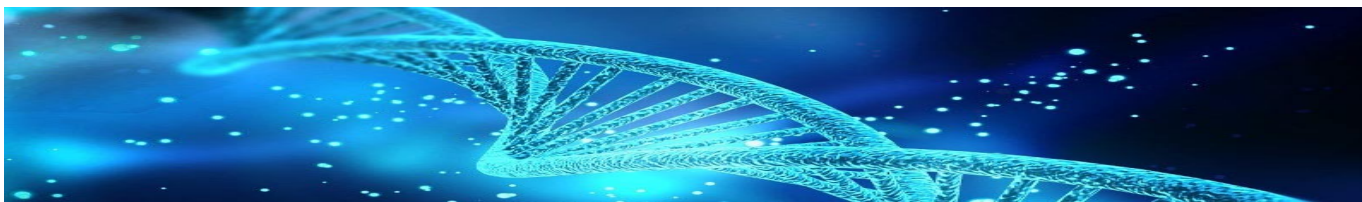
V.3 OBJETIVOS SECUNDARIOS

1.- Investigar si existe alguna relación entre los polimorfismos de las citoquinas y el desarrollo de las principales infecciones virales más frecuentes en los primeros meses postrasplante, como son la infección por CMV y poliomavirus BK.

2.- Analizar la posible existencia de interacciones entre estos SNPs y otras variables independientes fundamentales en desarrollo de RA, como es el uso de timoglobulina como terapia de inducción.



VI MATERIAL Y METODOS



VI.1 Diseño del estudio

Se trata de un estudio observacional de cohortes retrospectivo, a partir de una base de datos prospectiva de los pacientes trasplantados de nuestra unidad.

Los pacientes fueron estratificados en base a los SNPs evaluados, para poder analizar la influencia de los mismos en la incidencia de eventos clínicos relevantes.

El estudio fue aprobado por el comité ético del hospital y ha sido realizado de acuerdo con las Guías de Buena Práctica Clínica y los preceptos elaborados en la Declaración de Helsinki (MRC 1998) sobre los principios éticos para la investigación que involucra a seres humanos. Todos los pacientes fueron informados detalladamente de los objetivos del estudio y firmaron el consentimiento informado (Anexo).

VI.2 Material

VI.2.1 Pacientes

Se incluyeron 709 pacientes consecutivos que recibieron un trasplante renal en nuestro centro entre el 1 de enero de 2005 y el 31 de diciembre de 2013. Se definieron los siguientes criterios de inclusión y exclusión:

Criterios de inclusión

1. Pacientes mayores de 18 años que recibieron un trasplante renal de donante cadáver en nuestra unidad durante el periodo de estudio.
2. Que hubieran firmado el consentimiento informado.

Criterios de exclusión

1. Aquellos pacientes que habían recibido un trasplante previo.



2. Los que perdieron el injerto en el inmediato postrasplante y nunca llegaron a funcionar, comúnmente denominado como disfunción primaria del injerto.

3. Los pacientes de raza distinta a la caucásica.

4. Aquellos que murieron en el inmediato postrasplante.

La muestra que se incluyó en el análisis final fue de 498 de pacientes (Figura 16).

Se utilizó un grupo de sujetos sanos, procedentes del banco de donantes de sangre de nuestro hospital, como indicador de la frecuencia de los SNPs en la población local y para confirmar que los datos genotípicos de los marcadores estudiados se ajustaron a las frecuencias esperadas según el equilibrio de Hardy-Weinberg. Si algún polimorfismo se desviase de este equilibrio indicaría que dicho polimorfismo no es un buen marcador genético para nuestro estudio y los resultados no serían fiables⁶⁹. Por tanto, en el caso de que alguno de nuestros polimorfismos no se encontrase en equilibrio en la población sana, sería excluido para el análisis.

VI.2.2 Variables

Los datos que se recogieron de cada paciente los podemos dividir en variables independientes y eventos o variables dependientes.

VI.2.2.1 Variables independientes, enumeradas a continuación: características demográficas (sexo y edad de donante y receptor), causa de exitus del donante (cardiovascular, traumática, otras), tipo de donante (asistolia, muerte encefálica), tiempo de isquemia fría (en horas), causa de enfermedad renal del receptor (glomerulonefritis crónica, nefropatía tubulointersticial crónica, nefropatía diabética, enfermedad poliquística del adulto, nefropatía no filiada, otras), tipo de diálisis (hemodiálisis,



diálisis peritoneal, prediálisis), tiempo en diálisis previo al trasplante (en meses), características inmunológicas (Panel de Reactividad de Anticuerpos histórico máximo y actual, número de incompatibilidades HLA*A, B y DR), estatus serológico para citomegalovirus de donante y receptor (IgG CMV positivo o negativo), tratamiento inmunosupresor de inducción (uso o no de timoglobulina), SNPs de citoquinas (IL10 -1082G/-819C/-592C, TNF α -308A, INF γ +874T, IL18 -607C/-137G).

VI.2.2.2 Variables dependientes, que fueron las siguientes: FRR, RA, infección por CMV y BK, pérdidas de injerto y paciente.

Para el diagnóstico de **FFR** se utilizó la definición de necesidad de diálisis en la primera semana. Dado que los mecanismos de desarrollo de FRR y su influencia en la supervivencia del injerto es muy distinta según se trate de un donante en muerte encefálica o en asistolia, analizamos a las dos poblaciones por separado.

Los episodios de **rechazo agudo** fueron diagnosticados en base a criterios *analíticos* (ascenso de la creatinina sérica mayor de un 20% en base a la cifra más baja obtenida en el postrasplante inmediato), *histológicos*, ya que la mayoría de los casos fueron confirmados mediante biopsia renal percutánea y, *serológicos*, a partir de año 2009, con la determinación de anticuerpos anti-HLA circulantes. Para el estudio comparativo decidimos utilizar solo los casos de rechazo agudo vascular (RAV) y humoral (RAH), porque todos estaban constatados histológicamente, mientras que en los casos de rechazo más leves, había un porcentaje alto de no biopsiados, que recibieron tratamiento empírico con bolos de metilprednisolona.

Se consideró que un paciente tenía **infección por CMV** y debía ser tratada cuando la carga viral sérica de CMV era superior a 600 copias/ml o 3000 UI/ml, según técnica de PCR cuantitativa utilizada.



Con respecto a la *infección por poliomavirus BK*, la detección de una carga viral en orina superior a un millón de copias/ml, junto a cualquier grado de replicación sérica del virus en sangre, fue considerada como positiva y modificó el manejo del paciente durante el seguimiento.

La *pérdida del injerto* siempre llevó consigo la reinclusión en programa de diálisis o el retrasplante en situación prediálisis.

El *fallecimiento del paciente* por cualquier causa (infecciosa, cardiovascular o neoplásica) llevaba implícito la muerte con injerto funcionando.

VI.3 Métodos

VI.3.1 Ámbito de estudio y medios disponibles

El estudio se realizó en la Unidad de Trasplantes del Hospital Clínico San Carlos, dotado del equipamiento asistencial, material y personal necesario. Se trata de una unidad multidisciplinar en la que se encuentran integrados distintos especialistas:

- *Sección de Coordinación de Trasplantes*: cuentan con los medios necesarios para la detección y manejo del donante y están certificados conforme a la norma ISO 9001:2008 desde el año 2004. Colabora con el servicio de Nefrología y suministra todos los datos relacionados con las características del donante y el proceso de la donación.

- *Servicio de Nefrología*: acepta al donante y selecciona al receptor más idóneo según criterios clínicos e inmunológicos. Dispone de la infraestructura necesaria para encargarse de la recogida de muestras, el tratamiento y manejo posterior del receptor en planta. Al alta realiza un seguimiento estrecho del paciente en la consulta de trasplante, inicialmente semanal y posteriormente mensual o trimestral. Todos los datos del trasplante son incluidos en una "base madre".



- *Servicio de Inmunología*: sección dedicada al trasplante, que cuenta con los medios necesarios para el almacenamiento de muestras, extracción de DNA, determinación y análisis de los SNPs de las citoquinas mediante PCR a tiempo real (RT-PCR) y la detección de ADEs mediante ensayos en fase sólida.

- *Servicio de Microbiología*: departamento de serología viral, que dispone de la infraestructura básica para la extracción de DNA y determinación de carga viral cuantitativa de CMV y BK mediante RT-PCR.

- *Unidad de Investigación*: cuenta con epidemiólogos con amplia experiencia en estudios observacionales y ensayos clínicos, que colaboran en el diseño y análisis del estudio.

VI.3.2 Metodología para la realización de biopsia renal

En nuestro centro se realizan biopsias renales por indicación clínica y, además, en el caso de pacientes que reciben un injerto procedente de donante en asistolia, de protocolo. En este último caso, siempre que el injerto presente FRR, se llevó a cabo biopsias renales de protocolo a partir de la segunda semana postrasplante y con una periodicidad de 7-10 días, hasta que se objetivó un descenso significativo de la creatinina sérica.

Previo a la biopsia, realizamos una ecografía renal, para confirmar que no existe interposición de asas intestinales o del hilio vascular, que dificulte la punción percutánea y una determinación en sangre de tiempos de hemostasia primaria, que demuestre que los valores se encuentran dentro del rango de la normalidad (85-155 segundos) y el riesgo de sangrado es mínimo. Si no existe ninguna anomalía, se procedió a la punción percutánea ecoguiada. Para ello se utilizamos agujas de punción de 14 G semiautomáticas y como objetivo, si no fue técnicamente difícil, se intentaron extraer dos cilindros. Se consideró que la biopsia era representativa si incluía al menos dos



arterias de tipo muscular y 10 glomérulos. En el caso de que el injerto no esté accesible o los tiempos de hemostasia estén alargados, se procedió a la biopsia quirúrgica abierta.

VI.3.3 Metodología para el diagnóstico histológico de rechazo

Para establecer el diagnóstico histológico de RA nos basamos en la clasificación de Banff (Tabla 1), que nos permitió evaluar las lesiones agudas y clasificar los distintos grados de rechazo^{70, 71}. Como es sabido, esta clasificación ha sufrido diversas modificaciones en las sucesivas conferencias llevadas a cabo, que han supuesto una ampliación de los requisitos, de los criterios y un ajuste de las diferentes definiciones⁷².

Se evaluaron los distintos componentes del parénquima renal: glomérulos (g), túbulos (t), intersticio (i), vasos arteriales de calibre muscular (v), capilares peritubulares (cpt). Cada una de estas variables se valoró semicuantitativamente de 0 a 3, bien por número o por porcentaje.

Las técnicas de tinción básicas para la evaluación fueron hematoxilina-eosina, PAS y tricrómico para un total de siete secciones tisulares. Desde el 2007 realizamos además de manera rutinaria la tinción para C4d por inmunohistoquímica.

VI.3.3.1 Para el diagnóstico de rechazo agudo mediado por células T_h , la biopsia del injerto renal debía mostrar un mínimo del 25% de la extensión del parénquima ocupado por un infiltrado inflamatorio tubulointersticial (*score i2*), mostrar fenómeno de tubulitis moderada, es decir, más de 4 linfocitos interpuestos entre las células tubulares por sección transversal tubular (*score t2*), acompañado en algunos casos por edema intersticial y daño tubular. Las biopsias que mostraron menor extensión parenquimatosa ocupada por infiltrado inflamatorio (10-25% o *score i1*) y menor grado de tubulitis (1-4 células/túbulo o *score t1*) fueron catalogadas como cambios *borderline* sugestivos de



RA, que en aquellos casos donde funcionalmente se acompañaron de incremento agudo de la creatinina, se consideraron como un verdadero RA. El infiltrado en áreas con fibrosis, en corteza subcapsular, en adventicias de grandes venas y vasos linfáticos, no fue valorado.

Para la evaluación morfológica de la *tubulitis* tuvimos en cuenta las siguientes premisas:

1. Evaluar los túbulos más severamente dañados.
2. Observar tubulitis en más de un foco de la biopsia.
3. Aplicar el *score* exclusivamente a túbulos normales o levemente atróficos. No aplicar el *score* en áreas con moderada o severa atrofia tubular (< 50% calibre).
4. La observación de ruptura de membranas basales equivale al grado más severo de tubulitis (*score* t3).

La observación de cambios vasculares fue una condición definitoria del grado de RA. En este sentido, los tipos o grados de rechazo más severos fueron los rechazos agudos vasculares, que eran aquellos que mostraron *arteritis intimal o endotelialitis*. Esta lesión se describió ante la presencia de linfocitos o monocitos/macrófagos infiltrando la íntima, inmediatamente debajo del revestimiento de células endoteliales, ocasionando su proyección hacia la luz vascular en algunos casos. Al menos debía estar afectada una arteria (*score* v1). Los casos con endotelialitis moderada debían reducir la luz arterial > 25% (*score* v2) y las lesiones vasculares severas acompañadas de necrosis fibrinoide de la pared arterial categorizaron el grado más intenso de rechazo agudo celular (grado III).

Para la valoración de estas lesiones de forma adecuada se consideró que:



1. Se debía evaluar el vaso más afectado.
2. Para catalogar de vasculitis severa (v3) debía existir afectación transmural o cambios fibrinoides que indicaran necrosis de la pared muscular vascular.
3. La arteritis intimal podía estar presente de manera aislada, si bien lo habitual es que se encontrara el contexto de un rechazo agudo tubulointersticial.
4. El infiltrado inflamatorio rodeando la adventicia de las paredes vasculares arteriales o venosas no se consideró indicativo de endarteritis.

VI.3.3.2 Para el diagnóstico de rechazo agudo mediado por anticuerpos, se tuvieron en cuenta datos morfológicos e inmunopatológicos, en base a la séptima conferencia de Banff celebrada en 2003.

La *evidencia morfológica* de daño agudo tisular del injerto ante la respuesta inmune desencadenada se consideró en caso de la presencia de algunas de las siguientes lesiones, aunque ninguna de ellas es patognomónica de RAH:

- a. Daño tubular agudo.
- b. Neutrófilos o células mononucleares en capilares peritubulares (CPT) o glomerulares (capilaritis), o trombosis capilar.
- c. Arteritis intimal/necrosis fibrinoide/inflamación intramural o transmural en arterias.

La *evidencia inmunopatológica* de activación de anticuerpos con activación a su vez del complemento era puesta de manifiesto por el depósito de C4d o, raramente, inmunoglobulinas en CPT. La tinción de la superficie endotelial y pared capilar fue de carácter lineal, circunferencial y similar en corteza y en médula renal, o incluso más



intensa en esta última y varió entre débil/focal e intensa/difusa (> 50% de los capilares positivos), siendo este último patrón el considerado como característico de RAH.

Sobre el tejido incluido en parafina, la determinación de C4d se realizó mediante el empleo de un anticuerpo policlonal utilizando técnicas de amplificación basadas en polímeros conjugados con peroxidasa o micropolímeros (UltraVision Quanto).

VI.3.4 Metodología para la determinación de anticuerpos anti HLA

La detección de anticuerpos circulantes contra antígenos HLA del donante o anticuerpos donante-específicos (ADEs) es la *evidencia serológica* que confirma que un paciente ha sufrido o puede sufrir un RAH. Se extrajo muestra para su análisis cada vez que se realizó una biopsia renal por indicación clínica y de forma sistemática a 1, 3, 6 y 12 meses a todos los pacientes trasplantados a partir del año 2009.

La determinación de anticuerpos anti HLA de clase I y II se hizo mediante Screening por tecnología luminex y aquellos que resultaron positivos se les estudió las especificidades por Single Antigen (Tepnel Lifecodes LSA™ Stamford CT, Diagnostica Longwood). El sistema Luminex 100 IS 2.3 fue utilizado para la adquisición y análisis de los datos. Todas las esferas con una intensidad de fluorescencia media (IFM) superior a 3000 fueron consideradas como positivas. Este punto de corte fue elegido en base a nuestra experiencia, debido a que hemos encontrado RAH en pacientes con ADEs con IFM próximas o superiores a este valor y muy raramente en casos con valores de IFM inferiores al punto de corte mencionado.

VI.3.5 Tratamiento inmunosupresor utilizado

Nuestro protocolo de inmunosupresión ha sufrido cambios a lo largo del tiempo. Hasta el año 2009, los pacientes que recibían un injerto procedente de donante en



asistolia o con criterios expandidos, se les pautaba tratamiento con inhibidores de los receptores de la IL2 como inducción, pero a partir de dicho año empezó a generalizarse el uso de timoglobulina en estos casos.

La mayoría de los pacientes recibieron además tratamiento con tacrolimus (a una dosis de inicio de 0.05 mg/kg de peso/día y posterior ajuste para niveles entre 5-8 ng/ml), ácido micofenólico y metilprednisolona. Cuando la terapia de inducción se basaba en timoglobulina, el tacrolimus era introducido a partir del 4º-6º día postrasplante.

En el caso de donantes con criterios estándar o receptores sensibilizados con PRA>20%, el tratamiento no ha variado con los años. En el primer caso, se utilizó triple terapia convencional con tacrolimus (0,10 mg/kg de peso/día de inicio y posterior ajuste para niveles entre 7-10 ng/ml), micofenolato (2000 mg/día) y esteroides (dos bolos de MPN de 250 mg, uno pretrasplante y otro el primer día postrasplante, seguido de prednisona oral, 20-30 mg a partir de segundo día, con descenso progresivo posterior), mientras que en el segundo caso, la inducción con timoglobulina (0,5-1 mg/kg de peso/día, 6-8 días) fue la norma.

Cuando el paciente presentaba un episodio de rechazo agudo sin afectación vascular, se pautaron 3-5 bolos de metilprednisolona de 250 mg, mientras que la mayoría de los casos de RAV fueron rescatados con timoglobulina (4-5 mg/kg de peso en total). El tratamiento del RAH se basó en la administración de Inmunoglobulinas inespecíficas (1-2 g/kg de peso), junto con la realización de plasmaféresis (6-10 sesiones). En algunos casos de RAH severo con vasculitis y/o capilaritis importante, se pautaron 1-2 dosis de Rituximab 375 mg/m²).



VI.3.6 Metodología para la determinación de carga viral de CMV y BK

En ambos casos la detección y cuantificación se realiza mediante PCR a tiempo real (RT-PCR). El primer paso es siempre la extracción automática del DNA viral presente en las muestras.

VI.3.6.1 Extracción de DNA. Se llevó a cabo en el sistema automático Easy-MAG siguiendo las instrucciones del fabricante. Este sistema se basa en la capacidad que tiene la sílice magnética para fijar DNA y RNA en altas concentraciones de sal. El proceso permite la eliminación de prácticamente todos los compuestos presentes en los distintos tipos de muestra con capacidad para inhibir la PCR. Los ácidos nucleicos que se obtienen tienen una alta calidad y permiten su empleo para cualquiera de las técnicas moleculares que se usan normalmente en el laboratorio de Microbiología.

VI.3.6.2 Carga viral de CMV. Entre los años 2005-2013 se han utilizado dos RT-PCRs:

a) CMV R-Gene®. Argene (Biomérieux) Sirve para detectar y cuantificar el genoma del CMV en muestras de sangre total, plasma, LCR, etc. Las muestras se extraen en el sistema automático Easy-MAG ajustando los volúmenes de partida y elución a 200 µl y 50 µl respectivamente. En cada muestra se añade un control interno antes de iniciar el proceso con objeto de comprobar que tanto la extracción como la amplificación se realizan de forma adecuada. La PCR se lleva a cabo en un Termociclador 7500 Real Time PCR System de Applied Biosystem. La carga viral de cada muestra se expresa en copias/ml.

b) Simplexa™ CMV Focus Diagnostic. La extracción del ácido nucleico se realiza igual que en el caso anterior. También se emplea un control interno para valorar todo el proceso. Al igual que con el sistema de Argene, la señal de amplificación que se



obtiene por cada muestra se compara con una curva de calibración y se cuantifica. La PCR se lleva a cabo en el Sistema Integrated Cyclor 3M con el software Integrated Cyclor Studio versión 5.0. La carga viral de cada muestra se expresa en UI/ml.

La equivalencia entre las dos técnicas se evaluó antes de cambiar de sistema y pudo establecerse que, en ningún caso, las diferencias observadas eran mayores que 0,5 log₁₀. La equivalencia entre Unidades Internacionales y copias en el sistema de Focus es, aproximadamente, 1 copia = 4 UI.

VI.3.6.3 Carga viral de BK. Durante los años 2005-2013 se han empleado dos técnicas diferentes:

a) Affigene BKV trender- (Sangtec Molecular Diagnostic inicialmente y después distribuido por Biomerieux). La extracción se realiza también en el sistema Easy-Mag ajustando volúmenes de partida y elución a 500 µl y 60 µl respectivamente. Durante el proceso de extracción se añade un control interno que permite el seguimiento de todo el proceso. La sensibilidad de esta PCR a tiempo real es de 464 copias/ml. Permite la detección cuantitativa del DNA viral en un rango de 10³-10⁸ copias/ml. Es una técnica simple, rápida y robusta pero muy cara. La PCR se lleva a cabo en el Stratagene MX300 (Sangtec/Biomerieux) con el software affigene analysis®. Después de la compra de la compañía por Biomerieux se dejaron de fabricar los reactivos. Se probaron los disponibles en el mercado para seleccionar el que ofreciera los resultados más fiables y concordantes con el sistema Affigene. Se escogió el de Altona Diagnostic.

b) RealStart BKV PCR kit. Altona Diagnostics. El procesamiento de muestras y análisis de resultados es muy similar al que se emplea con el sistema Affigene. La extracción se realiza con los mismos volúmenes de partida y elución y se emplea el mismo termociclador y el mismo software para la obtención de resultados.



La principal diferencia entre los dos sistemas de cuantificación del virus BK, es que con este último debe incluirse una curva de calibración completa en cada ensayo y deben validarse los parámetros de la curva (coeficiente de regresión, pendiente, eficiencia) antes de poder obtener la carga viral de cada muestra. La carga viral se expresa en copias/ml.

VI.3.7 Metodología para el genotipado de SNPs de las citoquinas

Se realizó el aislamiento de DNA a partir de un tubo de sangre anticoagulada con EDTA. Los pasos que se siguieron fueron:

- a) Extracción de DNA por salting-out o por métodos automáticos (MagNA Pure) a partir de tubos de sangre anticoagulada con EDTA.
- b) Cuantificación y determinación de la pureza del DNA, en el espectrofotómetro Nanodrop.
- c) Análisis de los SNPs mediante ensayos con sondas TaqMan® en un sistema de RT-PCR 7900HT (Applied Biosystems).

Los ensayos TaqMan® (Figura 17) se basan, por una lado, en una *MasterMix* común a todos los ensayos compuesta de la enzima DNA polimerasa, nucleótidos, buffer, MgCl₂ y amperasa (para la degradación de cualquier amplicón inespecífico). Por otro lado, se comercializan los ensayos para cada SNP en los que incluyen los *primers* y las sondas específicas de alelo. Las sondas se encuentran marcadas en su extremo 5' con un fluoróforo FAM ó VIC, y en su extremo 3' presentan un *quencher* con actividad “secuestradora” de fluorescencia. La técnica, basada en una RT-PCR, asume que si la sonda encuentra el fragmento de DNA complementario se unirá a él de manera específica. Al encontrar la sonda hibridada, la DNA polimerasa mediante su



actividad exonucleasa 5'→ 3' actuará degradándola, provocando la liberación del *quencher* y permitiendo así la emisión de fluorescencia.

La cuantificación absoluta de la RT-PCR permite medir las emisiones de fluorescencia en cada ciclo de PCR, creando un gráfico de emisión de fluorescencia que permite observar el/los alelo/s que han amplificado, así como la calidad de la amplificación.

VI.3.8 Elección de los SNPs evaluados

Los genes se han seleccionado teniendo en cuenta dos premisas:

a) Genes codificadores de citoquinas con un importante papel en la respuesta aloimmune, ya sea por su poder pro-inflamatorio o bien antiinflamatorio.

b) Genes con SNPs funcionales bien documentados, de tal forma que generen diferencias cualitativas o cuantitativas en función del genotipo.

Los SNPs evaluados fueron los siguientes:

* IL10, localizados en las posiciones -1082 G/A (rs1800896) y -592 C/A (rs180872) de la región promotora del gen. Un tercer SNP, localizado en la posición -819 (C/T) fue inferido, dado que en la población caucásica solo pueden configurar tres haplotipos (GCC, ACC y ATA). Los pacientes se dividieron en función de que fueran portadores de GCC, el haplotipo de mayor producción de IL10.

* TNF α , localizado en la posición -308 G/A (rs1800629) de la región promotora del gen. Se estratificó a la población en dos grupos en función de que fueran portadores del alelo A (AA/GA), de producción alta e intermedia de TNF α , frente a los de baja producción (GG).



* IFN γ en la posición +874 A/T (rs2430561), localizado en el primer intrón del gen del IFN γ . Dividimos a los receptores en función de que fueran portadores del alelo T, relacionado con mayor producción (TT/TA frente a AA).

* IL18, localizados en las posiciones -607 A/C (rs1946518) y -137 C/G (rs187238) de la región promotora del gen. Se clasificó a los pacientes según haplotipo de mayor producción, dividiéndolos en portadores y no portadores de CG. También fueron estratificados por alelos, portadores de C (CC/CA) frente a no portadores (AA) en el caso del primer SNP, portadores de G (GG/GC) frente a no portadores (CC), en el caso del segundo.

VI.3.9 Análisis estadístico

Las variables cualitativas se presentaron con su distribución de frecuencias. Las variables cuantitativas se resumieron en su media y desviación estándar (DE) o su mediana y rango intercuartil (RIC p25-p75).

Se evaluó la asociación entre variables cualitativas con el test de χ^2 o prueba exacta de Fisher, en caso de que más de un 25% de los esperados fueran menores de 5. En variables ordinales se contrastó la hipótesis de tendencia ordinal de proporciones.

Se analizó el comportamiento de las variables cuantitativas por cada una de las variables independientes categorizadas mediante el test de la t de Student (en comparaciones de una variable con dos categorías). En caso de asimetría se utilizaron test no paramétricos, como el test de la mediana.

Se ajustaron modelos de regresión logística (RAV, FRR, Infección por CMV y BK) con el objeto de evaluar la asociación de aquellas variables que en análisis crudo el resultado de la p del contraste fuera inferior a 0.15 o se tratara de variables



biológicamente relevantes. Este modelo permitió identificar la relación entre un conjunto de variables explicativas y la probabilidad del evento, de las complicaciones más frecuentes, de las variables estudiadas. Se presentaron las “odds ratios” o razones de ventaja como estimador del riesgo relativo con su intervalo de confianza al 95%.

Se estimaron las funciones de supervivencia por el método de tabla de vida para las variables independientes para el estudio de la pérdida del injerto. Se presentaron las gráficas de las curvas estimadas. La comparación de las funciones de supervivencia de los distintos subgrupos se realizará mediante el test exacto de Breslow. Consistió en comparar el número de eventos observados en cada uno de los subgrupos con el número de eventos esperados en el caso de que la distribución de la variable dependiente fuera la misma en todas las categorías (hipótesis nula).

Se ajustó un modelo de regresión de riesgos proporcionales de Cox. Este modelo permitió identificar y evaluar la relación entre un conjunto de variables explicativas y el tiempo de ocurrencia de un evento y también predecir el tiempo de desarrollo de un episodio de rechazo a partir de los valores que toma en las variables explicativas o pronósticas.

$$h(t; X) = h_0(t) * e^{\beta'X} = h_0(t) * e^{(\beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \beta_3 x_3 + \dots + \beta_p x_p)}$$

Tasa de riesgo de un sujeto $[h(t; X)]$, con valores $X=(x_1; x_2; x_p)$ en las variables explicativas, en el instante t. Es la variable respuesta que se modeliza. Representa el riesgo de presentar un rechazo en el instante t, de los sujetos que tienen un determinado patrón de valores x en las variables explicativas.



Función exponencial ($e^{\beta X}$), cuyo exponente es la combinación lineal, sin término constante, de las p variables explicativas X_i .

Función de riesgo de referencia [$h_0(t)$] (“baseline” o “underlying hazard function”), que sólo depende del tiempo, llamada así porque representa las tasas instantáneas de riesgo de un sujeto hipotético con valor 0 en todas las variables predictivas.

Se evaluó la existencia de interacciones, introduciendo las variables independientes multiplicativas con pruebas de significación estadística y se mantuvieron en el modelo los términos de interacción estadísticamente significativos. Se presentaron las “razones de tasas” (HR) ajustadas junto a sus intervalos de confianza al 95%. La interpretación de los parámetros del modelo con signos positivos indicaron un aumento de la tasa instantánea de riesgo, es decir, un peor pronóstico del sujeto para un valor alto de la variable x . Un parámetro β con signo negativo indicó mejor pronóstico para un valor alto en la variable x . La contribución de una variable x se valoró con el exponente e^{β} , que es el factor por el cual se multiplica la tasa de riesgo instantáneo de un sujeto cuando la variable x se incrementa en una unidad. Este exponente se interpretó como el riesgo relativo en el instante t de los sujetos. En variables dicotómicas es pasar de la ausencia (0) a la presencia (1) del factor x . En variables cuantitativas el incremento lineal de la tasa de riesgo cuando se incrementa la variable x en una unidad. Este aumento es proporcional en todos los valores que toma la variable. En variables policotómicas (más de dos categorías) una categoría se tomó como referencia y por lo tanto el HR es de 1. El resto de las categorías se compararon frente a la de referencia.

Los supuestos básicos que deben de cumplir los datos para poder aplicar dicho modelo son sobre todo de la parte paramétrica, ya que la contribución de las diferentes variables explicativas en la predicción de la supervivencia, o más precisamente, de la



tasa instantánea de riesgo, es la misma en cualquier momento de tiempo de seguimiento.

La parte no paramétrica del modelo no impone ningún supuesto sobre la forma de distribución de los tiempos de supervivencia.

En todos los contrastes de hipótesis se rechazó la hipótesis nula con un error de tipo I o error α menor a 0,05.

El paquete informático utilizado para el análisis fue SPSS para Windows versión 15.0.

VI.3.9.1 Limitaciones del estudio

Validez interna

1. Sesgo de selección. Consecutivos son todos, pequeño % de pérdidas iniciales y una población muy controlada desde la unidad de trasplante. Existen mecanismos constantes de seguimiento del paciente. La ausencia de genotipado de los receptores superior al 90% entre los años 2000-2005, hizo que descartáramos a esta población para el estudio.

2. Sesgos de mala clasificación. Consulta protocolizada y sistematizada de recogida de datos y seguimiento de los pacientes. Alta validez y fiabilidad de las técnicas de determinación.

3. Factores de confusión. Dada la experiencia del equipo investigador en esta área, se conocen bastante bien los posibles factores de confusión del estudio y se hizo una recogida sistemática de los mismos.

Validez externa

Elevada representatividad al ser todos consecutivos.



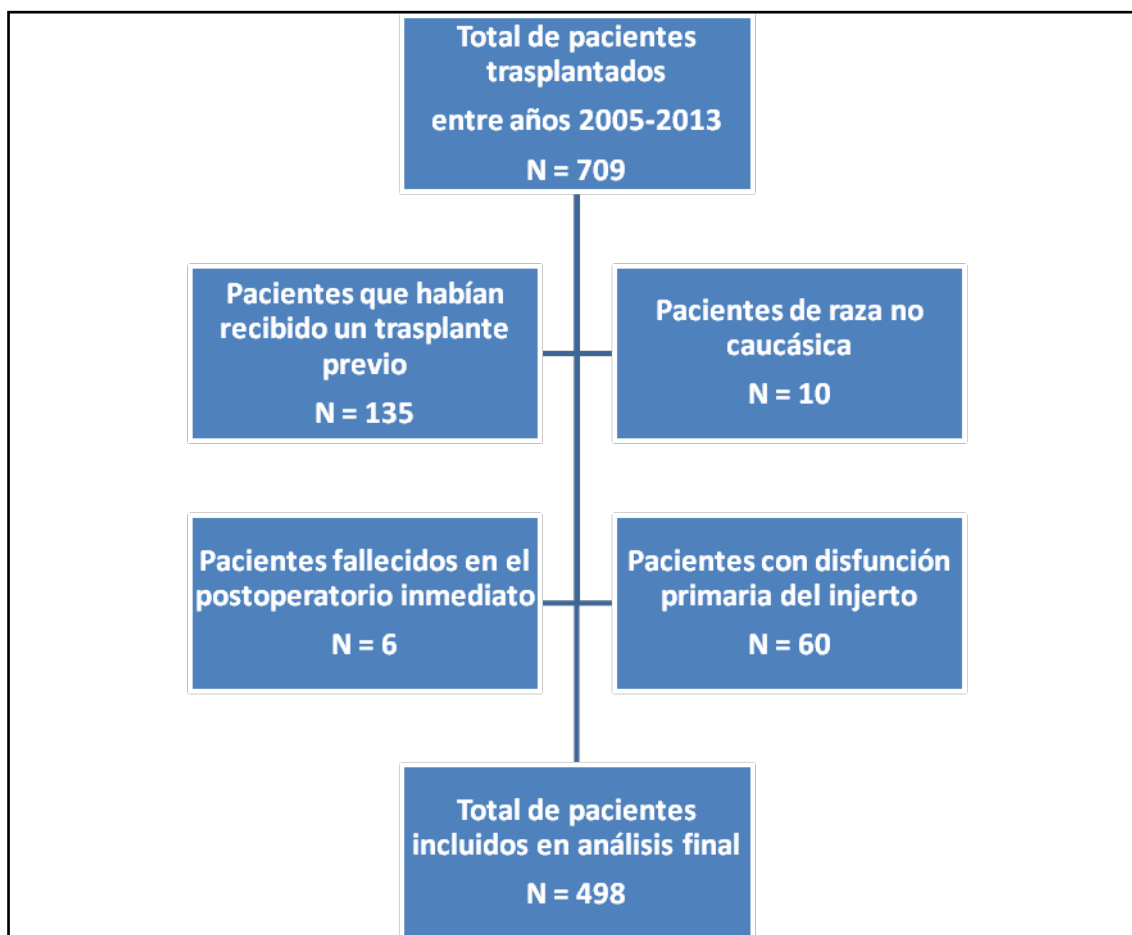


Figura 16. Diagrama de flujo de población de receptores renales estudiados.

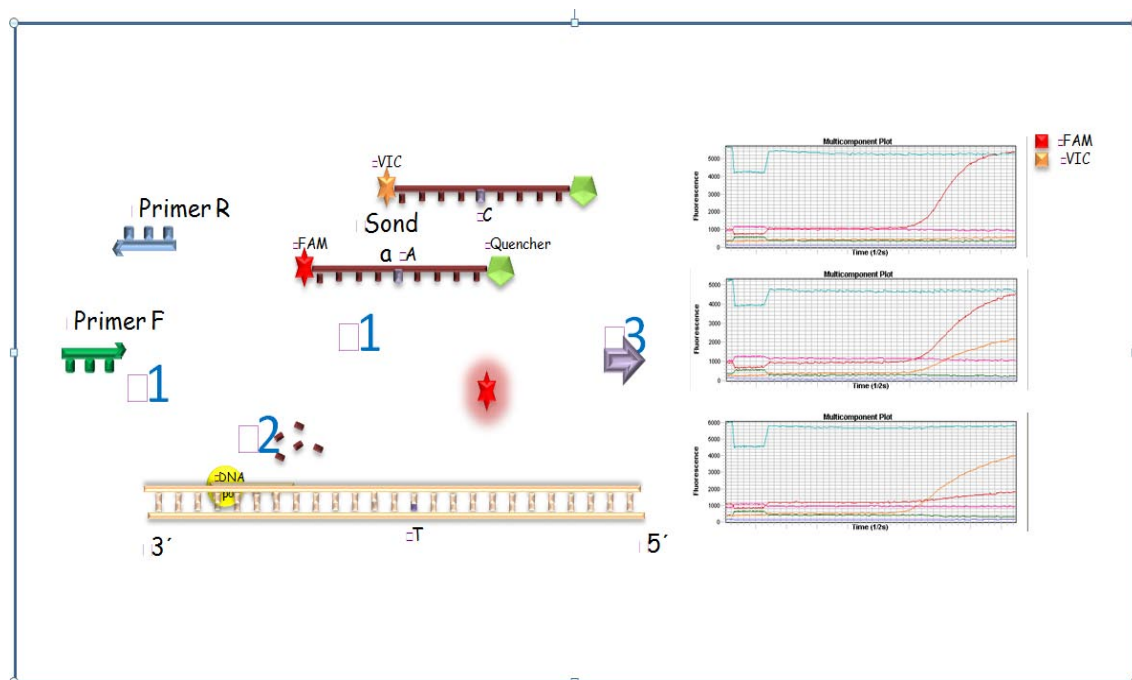


Figura 17. Genotipado de SNPs: Tecnología TaqMan.



Tabla 1. Clasificación de Banff utilizada para la graduación del rechazo.

Categorías de diagnóstico de la biopsia del injerto renal Banff 1997 y actualización Banff 2009
1. Normal.
2. Cambios mediados por anticuerpos:
2.a. Depósitos de C4d sin evidencia morfológica de rechazo activo.
2.b. Rechazo agudo mediado por anticuerpos: C4d+ , con ADEs circulantes y evidencia morfológica: inflamación mínima (<i>NTA like</i>), capilaritis (ptc/g >0) y/o endotelialitis (v3).
2.c. Rechazo crónico activo mediado por anticuerpos.
3. Cambios borderline o sospechoso de rechazo agudo mediado por células T: No hay arteritis intimal pero si focos de tubulitis (t1-t3) con inflamación intersticial mínima (i0, i1) o inflamación intersticial (i2, i3) pero con tubulitis mínima (t1)
4. Rechazo agudo mediado por células T:
IA. Inflamación intersticial (i2, i3) y tubulitis moderada (t2).
IB. Inflamación intersticial (i2, i3) y tubulitis grave (t3).
IIA. Arteritis intimal leve (v1).
IIB. Arteritis que afecta a >25% del área luminal (v2).
III. Arteritis transmural o cambios fibrinoides.
5. Fibrosis intersticial y atrofia tubular sin evidencia de ninguna etiología específica.
6. Otros (cambios no considerados secundarios a rechazo).



VII RESULTADOS



VII.1 Análisis descriptivo de la población

Las características demográficas de donante y receptor se resumen en la Tabla 2.

La causa más frecuente de fallecimiento de los donantes fue la cardiovascular (70%) y su edad media fue inferior a 45 años, lo que está en estrecha relación con el tipo de donante. La donación en asistolia es la fuente mayoritaria de riñones en nuestra unidad y el rango de edad utilizado como criterio de selección en este grupo se encuentra establecido entre los 16 y 55 años. Además, en el pool de donantes en muerte encefálica están incluidos un 3% (14/498) de donantes pediátricos.

Con respecto a las características del receptor, hay que destacar la existencia de casi un 10% de receptores que se trasplantan en situación prediálisis y los que lo hacen procedente de diálisis, permanecen bajo este tratamiento durante menos de 2 años (mediana de 17 meses, RIC: 16-21 meses).

Desde el punto de vista inmunológico, solo un 6,5% de los pacientes tenían un PRA histórico positivo, derivado de embarazos (10/33 pacientes, 2%) y/o transfusiones (23/33). Sin embargo, existe un alto porcentaje de terapia de inducción: 2/5 partes reciben un antagonista de los receptores de la IL2 (antiIL2R) y otras 2/5 partes de la población timoglobulina, de tal forma que menos de un 22% va con triple terapia convencional (Tabla 3). Este dato también está asociado al tipo de donante, ya que la inducción se utiliza en casos de donantes en asistolia o con criterios expandidos (casi la mitad de los donantes en muerte encefálica de nuestra población), en un intento de minimizar o retrasar el anticalcineurínico por su nefrotoxicidad y probable agravamiento de las lesiones por isquemia-reperusión.



Tabla 2. Características demográficas de la población estudiada.

Edad del donante (años) (media, DE)	44 (14)
Sexo del donante (n, % hombres)	358 (72)
Causa de exitus (n, %)	
- Cardiovascular	348 (70)
- Traumatismo	99 (20)
- Otros	51 (10)
Tipo de donante (n, %)	
- Asistolia	299 (60)
- Muerte encefálica	199 (40)
Edad del receptor (años) (media, DE)	53 (13)
Sexo del receptor (n, % hombres)	326 (65,5)
Causa de ERC de base (n, %)	
- Glomerulonefritis	158 (32)
- No filiada	87 (17,5)
- Poliquistosis	77 (15,5)
- Nefropatía diabética	63 (12,5)
- Nefropatía tubulointersticial	57 (11,5)
- Otras	56 (11)
Tipo de diálisis pretrasplante (n, %)	
- Hemodiálisis	342 (69)
- Diálisis peritoneal	108 (22)
- Prediálisis	48 (9)
Tiempo en diálisis (meses) (mediana, RIC)	17 (7-31)
Tiempo de isquemia fría (horas) (mediana, RIC)	18 (16-21)



Tabla 3. Terapia inmunosupresora utilizada y características inmunológicas de la población.

Tratamiento inmunosupresor (n, %)	
- Timoglobulina+FK+MMF+P	182 (36,5)
- AntiIL2R+FK+MMF+P	203 (40)
- FK+MMF+P	104 (21,5)
- Timoglobulina+EVL+MMF+P	9 (2)
Grupo sanguíneo (n, %)	
- 0	201 (40,5)
- A	225 (45)
- B	62 (12,5)
- AB	10 (2)
Anticuerpos anti HLA max >0% (n, %)	33 (6,5)
Anticuerpos anti HLA presentes (n, %)	
0%	488 (98)
0-20%	10 (2)
Mismatch A (n, %)	
≤1	247 (49,5)
2	251 (50,5)
Mismatch B (n, %)	
≤1	276 (56)
2	219 (44)
Mismatch DR (n, %)	
≤1	218 (43,5)
2	286 (56,5)

FK=tacrolimus, MMF=micofenolato, P=prednisona, AntiIL2R=Antagonista receptor IL2, EVL=Everolimus



6.2 Eventos del estudio

La incidencia de las variables dependientes o "*end points*" primarios y secundarios de nuestro estudio se describen en la tabla 4. Como era de esperar, se observó una mayor incidencia de FRR en los trasplantes renales de donantes en asistolia frente a aquellos procedentes de muerte encefálica, 65% vs 20%. En los casos en los que existió FRR, se necesitaron 18 días (RIC 14-24) hasta objetivar una mejoría de la función renal, sin diferencias significativas en función del tratamiento de inducción utilizado. En el caso de los receptores que recibieron un antiIL2R, la creatinina sérica disminuyó a partir de los 17,5 días (RIC 13-23), mientras que los de timoglobulina lo hicieron a los 19 días (RIC 15-24, $p=0,118$).

Con respecto al rechazo agudo, se objetivó una incidencia del 28%, siendo el RAV el más prevalente, seguido del rechazo agudo celular (RAC) sin afectación vascular y el RAH. Éste último se detectó siempre asociado a RAC o RAV, excepto en 2 pacientes, en los que la biopsia mostró datos de rechazo humoral o mediado por anticuerpos, sin lesiones sugestivas de daño por células T. En los pacientes con RA, la histología más habitualmente encontrada (78/132) fue la presencia de arteritis leve, acompañado o no de infiltrado túbulointersticial (Tabla 5). Casi la mitad de los casos catalogados como rechazo tipo IIA, el hallazgo más destacable fue la presencia de 3-4 células a nivel subintimal en una arteria de mediano calibre, con escasa afectación tubulointestinal ($t \leq 1$ y/o $i \leq 1$). El 75% de los episodios de RA tuvieron lugar durante las dos primeras semanas postrasplante y solo un 10% tuvo más de un episodio.

La mitad de los RA tipo IIA fueron rescatados con timoglobulina, mientras que un 42% fueron tratados con bolos de 6-metilprednisolona y un 8% no recibieron ningún



tratamiento adicional. Aquellos de mayor severidad (>IIA) fueron tratados con timoglobulina en el 100% de los casos.

La incidencia de infección por CMV y BK fue del 37% y 10%, respectivamente, a pesar de casi el 80% de los pacientes recibieron terapia de inducción (Tabla 4). Hasta septiembre de 2008 se hizo profilaxis con valganciclovir solo en grupo de máximo riesgo (IgG CMV donante positiva y receptor negativa, 15% del global), pero a partir de dicha fecha también se incluyó en el grupo de profilaxis para CMV a aquellos receptores que recibieron timoglobulina como terapia de inducción o de rescate, consiguiendo disminuir la incidencia de infección por CMV de 59% a 32% ($p=0,036$). Ambas infecciones virales tuvieron lugar, en la mayoría de los casos, entre el 1º y 7º mes postrasplante, siendo algo más precoz la replicación viral por CMV. La infección por BK se detectó a los 4 meses del trasplante (RIC 2,5-7), mientras que la de CMV apareció a los 2 meses (RIC 1-5).

Los datos de supervivencia de injerto y receptor a 5 años son del 89 y 92%, respectivamente, con una mediana de seguimiento de 55 (31-87) meses. Entre las principales causas de pérdida del injerto están el rechazo, agudo y crónico (55%), la recidiva de la enfermedad renal de base (10%) y la nefropatía por poliomavirus BK (5%). Los 39 pacientes fallecidos durante el seguimiento, lo hicieron por las siguientes causas: infecciosa (17/39, 43,5%), neoplásica (12/39, 31%) y cardiovascular (10/39, 25,5%).



Tabla 4. Incidencia y momento de la evolución del evento clínico en la población estudiada.

FRR (n, %)	
- Global	239 (48)
- Donante en asistolia	194 (65)
- Donante en muerte encefálica	39 (20)
Días hasta descenso creatinina (mediana, RIC)	18 (14-24)
RA (n, %)	140 (28)
RAV (n, %)	100 (20)
RAH (n, %)	25 (5)
Días hasta RA (mediana, RIC)	9 (7-16)
CMV (n, %)	
- Infección	183 (37)
- Enfermedad	32 (6,5)
Meses hasta CMV (mediana, RIC)	2 (1-5)
Infección por virus BK (n, %)	49 (10)
Meses hasta infección por BK (mediana, RIC)	4 (2,5-7)
Pérdida del injerto (n, %)	45 (9)
Muerte (n, %)	39 (8)
Tiempo de seguimiento (meses) (mediana, RIC)	55 (31-87)

FRR=función renal retardada, RA=rechazo agudo, RAV=rechazo agudo vascular, RAH=rechazo agudo humoral o mediado por anticuerpos, CMV=citomegalovirus.



Tabla 5. Tipos y severidad de los episodios de rechazo agudo según clasificación de Banff.

Rechazo agudo mediado por células T		n (%)
Rechazo agudo celular	○ Borderline	15 (3)
	○ IA	7 (1,5)
	○ IB	10 (2)
	○ No biopsiado	8 (1,6)
Rechazo agudo vascular	○ IIA	78 (15,7)
	○ IIB	10 (2)
	○ III	10 (2)

6.3 Análisis de frecuencia de los SNPs evaluados. Correlación de los mismos con las características de la población

Los SNPs fueron genotipados en más del 90% de la población estudiada, excepto el IFN γ +874 A/T, para el cual solo tenemos datos del 78% de los pacientes.

Analizamos la frecuencia de cada SNPs en un grupo de controles sanos (N=732), procedentes del banco de donantes de sangre del hospital, y en nuestra población trasplantada (Tablas 6, 7 y 8). Los resultados obtenidos en la población local sana confirmó que los datos genotípicos se ajustaron a las frecuencias esperadas según el equilibrio de Hardy-Weinberg para todos los marcadores excepto para el SNP de IL18 - 607 C/A, que se descartó para el análisis comparativo por este motivo.



La distribución genotípica de los SNPs de la IL10 en nuestra población trasplantada fue similar a la del grupo control, con una ligera mayor proporción de los genotipos CA y AA en el caso de IL10 -592 C/A (Tabla 6).

Tabla 6. Frecuencia de los SNPs de la IL10 en un grupo control sano y en nuestra población trasplantada.

	Población sana n (%)	Trasplantes n (%)	OR (IC 95%)	p
IL10 -1082 G/A				
GG	117 (16)	85 (18,4)	0,85 (0,62-1,16)	0,286
GA	355 (48,5)	213 (46)	1,11 (0,87-1,41)	0,401
AA	260 (35,5)	165 (35,6)	0,99 (0,77-1,28)	0,967
EHW	p=0,82	p=0,27		
IL10 -592 C/A				
CC	414 (56,6)	262 (56,6)	1,00 (0,78-1,27)	0,992
CA	264 (30,1)	159 (34,3)	1,08 (0,84-1,39)	0,544
AA	54 (7,3)	42 (9,1)	0,80 (0,51-1,24)	0,294
EHW	p=0,19	p=0,015		
Haplotipo Pro IL10				
GCC	473 (39,4)	298 (40)	0,97 (0,80-1,18)	0,780
ACC	409 (34,1)	246 (33,1)	1,05 (0,86-1,28)	0,644
ATA	318 (26,5)	200 (26,8)	0,98 (0,79-1,21)	0,853

EHW=equilibrio de Hardy-Weinberg



En los trasplantados renales, el TNF α -308 G/A también tuvo una distribución distinta con respecto a la población sana, con una mayor proporción del genotipo poco productor. No se objetivaron diferencias entre la población sana y la trasplantada en el caso de los genotipos del IFN γ +874 A/T (Tabla 7).

Tabla 7. Frecuencia de los SNPs del TNF α y el IFN γ en un grupo control sano y en nuestra población trasplantada.

	Población sana n (%)	Trasplantes n (%)	OR (IC 95%)	p
TNFα -308 G/A				
GG	545 (77,7)	367 (82,7)	0,73 (0,53-1,00)	0,044
GA	147 (21)	69 (15,5)	1,44 (0,04-2,00)	0,022
AA	5 (1,3)	8 (1,8)	0,71 (0,25-2,03)	0,480
EHW	p=0,79	p=0,03		
IFN γ +874 A/T				
AA	152 (25,4)	112 (28,9)	0,98 (0,72-1,32)	0,866
AT	275 (51,3)	196 (50,5)	1,03 (0,79-1,35)	0,812
TT	109 (20,3)	80 (20,6)	0,98 (0,70-1,38)	0,916
EHW	p=0,45	p=0,73		

EHW=equilibrio de Hardy-Weinberg

Para el SNP -137 G/C de la IL18, las frecuencias de los datos genotípicos se ajustaron a las esperadas según el equilibrio de Hardy-Weinberg, aunque se observó una menor proporción del genotipo homocigoto para C en los trasplantados frente a la población sana (Tabla 8).



Tabla 8. Frecuencia de los SNPs de la IL18 en un grupo control sano y en nuestra población trasplantada.

	Población sana n (%)	Trasplantes n (%)	OR (IC 95%)	p
IL18 -607 C/A				
CC	214 (31,8)	146 (32,1)	0,99 (0,76-1,29)	0,932
CA	305 (45,4)	236 (51,9)	0,77 (0,60-0,99)	0,033
AA	153 (22,8)	73 (16)	1,54 (1,12-2,13)	0,006
EHW	p=0,03	p=0,17		
IL18 -137 G/C				
GG	339 (50,4)	227 (49,9)	1,02 (0,80-1,31)	0,855
GC	264 (39,6)	198 (43,5)	0,85 (0,66-1,09)	0,188
CC	67 (10,0)	30 (6,6)	1,57 (0,98-2,52)	0,047
EHW	p=0,17	p=0,49		
Haplotipo Pro IL18				
AC	333 (31,9)	228 (31,4)	1,03 (0,83-1,26)	0,780
AG	192 (18,4)	117 (16,1)	1,17 (0,91-1,52)	0,644
CG	519 (49,7)	382 (52,5)	0,89 (0,74-1,08)	0,241

EHW=equilibrio de Hardy-Weinberg



Tabla 9. Características de la población estudiada según SNP de la IL10 -1038 G/A.

IL10 -1082 G/A N=463	GG/GA (n, %) N=298	AA (n, %) N=165
Edad receptor (>60 años)	97 (32,6)	54 (32,7)
Sexo receptor (% hombres)	207 (69,5)	100 (60,6)*
Edad donante (>60 años)	20 (6,7)	16 (9,7)
Sexo donante (% hombres)	213 (71,7)	122 (74,8)
Tipo trasplante (% Asistolia)	189 (63,4)	105 (63,6)
Tiempo isquemia fría >18 horas	154 (52,4)	79 (48,5)
Tiempo en diálisis >2 años	106 (35,7)	52 (31,5)
Inducción con timoglobulina	121 (40,6)	60 (36,4)
Anticuerpos máximos >0%	16 (5,4)	13 (7,9)
Mismatch DR=2	125 (42,1)	74 (44,8)
FRR	138 (46,3)	79 (47,9)
RAV	55 (18,5)	36 (21,8)
Infección por CMV	107 (36,4)	61 (38,4)
Infección por virus BK	25 (8,4)	11 (6,7)
Pérdida injerto	27 (9,1)	8 (4,8)

FRR=función renal retardada, RAV=rechazo agudo vascular, CMV=citomegalovirus.

*p<0,05

En el caso del SNP de IL10 -1082 G/A (Tabla 9), las poblaciones resultantes de la clasificación según el genotipo de mayor (GG/GA) o menor producción (AA) tenían un perfil muy semejante. Únicamente se diferenciaron en la presencia de una mayor proporción de hombres en el genotipo GG/GA. Para el SNP de IL10 -592 C/A (Tabla



10) ocurrió algo similar con el sexo, habiendo además una mayor incidencia de pacientes sensibilizados en el grupo con el genotipo de menor producción.

Tabla 10. Características de la población estudiada según SNP de la IL10 -592 C/A.

IL10 -592 C/A N=463	CC/CA (n, %) N=420	AA (n, %) N=43
Edad receptor (>60 años)	141 (33,6)	10 (23,3)
Sexo receptor (% hombres)	287 (68,3)	20 (46,5)*
Edad donante (>60 años)	33 (7,9)	3 (7)
Sexo donante (% hombres)	306 (73,4)	29 (67,4)
Tipo trasplante (% Asistolia)	265 (63,1)	29 (67,4)
Tiempo isquemia fría >18 horas	210 (50,7)	23 (53,5)
Tiempo en diálisis >2 años	143 (34,1)	15 (34,9)
Inducción con timoglobulina	161 (38,3)	20 (46,5)
Anticuerpos máximos >0%	23 (5,5)	6 (14)*
Mismatch DR=2	178 (42,5)	21 (48,8)
FRR	197 (46,9)	20 (46,5)
RAV	84 (20)	7 (16,3)
Infección por CMV	148 (36)	22 (52,4)
Infección por BK	32 (7,6)	4 (9,3)
Pérdida injerto	33 (7,9)	2 (4,7)

FRR=función renal retardada, RAV=rechazo agudo vascular, CMV=citomegalovirus.

*p<0,05



Las poblaciones que surgieron de la división según el genotipado del SNP de TNF α -308 G/A fueron idénticas en cuanto a características demográficas e inmunológicas (Tabla 11). Sin embargo, existió una mayor incidencia de rechazo en el grupo con el genotipo de mayor producción.

Tabla 11. Características de la población estudiada según SNP del TNF α -308 G/A.

TNF α -308 G/A N=440	AA/GA (n, %) N=75	GG (n, %) N=365
Edad receptor (>60 años)	24 (32)	121 (33,2)
Sexo receptor (% hombres)	47 (62,7)	242 (66,3)
Edad donante (>60 años)	4 (5,3)	29 (7,9)
Sexo donante (% hombres)	51 (69,9)	270 (74,2)
Tipo trasplante (% Asistolia)	46 (61,3)	235 (64,4)
Tiempo isquemia fría >18 horas	34 (46,6)	194 (53,7)
Tiempo en diálisis >2 años	27 (36)	125 (34,3)
Inducción con timoglobulina	28 (37,3)	139 (38,1)
Anticuerpos máximos >0%	7 (9,3)	22 (6)
Mismatch DR=2	33 (44)	160 (44)
FRR	38 (50,7)	166 (45,5)
RAV	26 (34,7)	64 (17,6)*
Infección por CMV	31 (41,9)	130 (36,5)
Infección por virus BK	5 (6,7)	28 (7,7)
Pérdida injerto	8 (10,7)	25 (6,8)

FRR=función renal retardada, RAV=rechazo agudo vascular, CMV=citomegalovirus.

*p<0,05



En el caso del SNP de IFN γ +874 A/T, las poblaciones eran muy similares, existiendo solo diferencias en la proporción de pacientes sensibilizados, algo mayor en el grupo asociado con menor producción (Tabla 12).

Tabla 12. Características de la población estudiada según SNP del IFN γ +874 A/T.

INF γ +874 A/T N=387	TT/AT (n, %) N=277	AA (n, %) N=110
Edad receptor (>60 años)	98 (35,4)	31 (28,2)
Sexo receptor (% hombres)	179 (64,6)	80 (72,7)
Edad donante (>60 años)	21 (7,6)	6 (5,5)
Sexo donante (% hombres)	207 (75)	75 (69,4)
Tipo trasplante (% Asistolia)	173 (62,5)	69 (62,7)
Tiempo isquemia fría >18 horas	152 (55,3)	56 (51,9)
Tiempo en diálisis >2 años	93 (33,7)	40 (36,4)
Inducción con timoglobulina	97 (35)	37 (33,6)
Anticuerpos máximos >0%	15 (5,4)	12 (10,9)*
Mismatch DR=2	110 (39,9)	52 (47,3)
FRR	132 (47,7)	47 (42,7)
RAV	60 (21,7)	24 (21,8)
Infección por CMV	110 (40,7)	39 (36,4)
Infección por virus BK	17 (6,1)	9 (8,2)
Pérdida injerto	27 (9,7)	5 (4,5)

FRR=función renal retardada, RAV=rechazo agudo vascular, CMV=citomegalovirus.

*p<0,05



Con respecto a los SNPs de IL18, se observó que existían diferencias únicamente en la incidencia de infección por CMV (tabla 13). En el caso del SNP -137 G/C además se detectaron diferencias en el tiempo en diálisis y la presencia de FRR, ambos parámetros muy relacionados entre sí.

Tabla 13. Características de la población estudiada según SNP del IL18 -137 G/C.

IL18 -137 G/C N=454	GG/GC (n, %) N=425	CC (n, %) N=29
Edad receptor (>60 años)	139 (32,7)	9 (31)
Sexo receptor (% hombres)	286 (67,3)	15 (51,7)
Edad donante (>60 años)	33 (7,8)	2 (6,9)
Sexo donante (% hombres)	306 (72,3)	21 (75)
Tipo trasplante (% Asistolia)	269 (63,3)	19 (65,5)
Tiempo isquemia fría >18 horas	213 (50,8)	14 (48,3)
Tiempo en diálisis >2 años	150 (35,4)	5 (17,2)*
Inducción con timoglobulina	163 (38,4)	13 (44,8)
Anticuerpos máximos >0%	28 (6,6)	0
Mismatch DR=2	179 (42,2)	17 (58,6)
Profilaxis con valganciclovir	206 (48,6)	16 (55,2)
Grupo de riesgo CMV (IGG D+/R-)	61 (14,5)	4 (14,3)
FRR	203 (47,8)	9 (31)*
RAV	84 (19,8)	7 (24,1)
Infección por CMV	161 (38,7)	5 (17,9)*
Infección por virus BK	33 (7,8)	3 (10,3)
Pérdida injerto	32 (7,5)	3 (10,3)

FRR=función renal retardada, RAV=rechazo agudo vascular, CMV=citomegalovirus. *p<0,05



VII.2 Análisis univariable y multivariable para rechazo agudo vascular

Los resultados del análisis univariable para el evento de RAV se muestran en las Tablas 14, 15 y 16. Las variables asociadas significativamente con mayor riesgo de RAV fueron edad de donante y receptor, PRA máximo, inducción con timoglobulina y el SNP de TNF α -308 A/G. Los pacientes portadores del alelo A tuvieron un riesgo superior al doble de desarrollar un episodio de RAV durante el seguimiento frente a los pacientes con el genotipo GG, relacionado con menor producción de TNF α (OR=2,48; IC 95%: 1,44-4,29; p=0,001). La presencia de FRR también se relacionó de forma significativa con el RAV, de tal forma que los pacientes con FRR tuvieron dos veces más riesgo de presentar un RAV (OR=2,00; IC 95%: 1,27-3,15; p=0,002). No se encontró ninguna asociación con el resto de SNPs estudiados.

Además, al estratificar a los pacientes en función de si recibieron o no timoglobulina como inducción, se encontró una asociación entre los SNPs del TNF α y el RAV, de tal forma que los portadores del genotipo GA/AA (haplotipo de mayor producción) que no recibieron timoglobulina, tuvieron mayor riesgo de RAV que los portadores de GG (OR=2,92; IC 95%: 1,58-5,61; p=0,001) (Figura 18).

Las variables que se utilizaron para ajustar el modelo que evaluó la incidencia de RAV fueron: edad de donante y receptor, inducción con timoglobulina, presencia de FRR, PRA máximo y SNP de TNF α -308 A/G. El PRA actual y mismatch para DR también fueron incluidos aunque no alcanzaron la significación estadística en el univariable, debido a que son factores de riesgo de rechazo bien documentados en la literatura. El SNPs del TNF α , mantuvo la significación estadística, de forma que los portadores del alelo A tuvieron casi tres veces más riesgo de desarrollar RAV (OR=2,64; IC: 1,46-4,76; p=0,001).



Tabla 14. Análisis univariable de rechazo agudo vascular y características demográficas (N=498).

	<i>Rechazo agudo vascular n (%)</i>	<i>OR (IC 95%)</i>	<i>p</i>
Edad receptor			
< 60 años	73 (22,2)	1,71 (1,03-2,83)	0,035
≥ 60 años	24 (14,3)	1	
Edad donante			
< 60 años	94 (20,6)	3,19 (0,96- 10,58)	0,046
≥ 60 años	3 (7,5)	1	
Sexo receptor			
Hombre	67 (20,6)	2,81 (0,77-10,18)	0,421
Mujer	30 (17,5)	1	
Sexo donante			
Hombre	75 (21,1)	1,39 (0,82-2,35)	0,210
Mujer	22 (16,1)	1	
Tiempo en diálisis			
≤2 años	63 (19,3)	1	0,944
> 2 años	33 (19,5)	1,01 (0,63-1,62)	
Tipo de donante			
Asistolia	67 (21,5)	1,42 (0,88-2,29)	0,141
Muerte encefálica	30 (16,1)	1	
Tiempo de isquemia fría			
≤18 horas	47 (19,8)	1	0,968
>18 horas	50 (19,7)	1,00 (0,64-1,57)	



Tabla 15 . Análisis univariable de rechazo agudo vascular y características inmunológicas (N=498).

	<i>Rechazo agudo vascular n (%)</i>	<i>OR (IC 95%)</i>	<i>p</i>
Función renal retardada			
Si	60 (25,1)	2,00 (1,27-3,15)	0,002
No	37 (14,3)	1	
Timoglobulina en inducción			
Si	15 (7,9)	0,23 (0,13-0,42)	<0,001
No	82 (26,7)	1	
PRA máximo			
0%	85 (18,3)	1	0,008
>0%	12 (37,5)	2,68 (1,26-5,69)	
PRA actual			
0%	93 (19,1)	1	0,100
>0%	4 (40)	2,81 (0,77-10,18)	
Mismatch DR			
≤1	49 (22,4)	1	0,130
2	47 (17)	1,41 (0,90-2,20)	
Mismatch B			
≤1	41 (19)	1	0,853
2	55 (19,6)	1,04 (0,66-1,63)	
Mismatch A			
≤1	54 (22)	1	0,765
2	46 (20,7)	0,98 (0,65-1,41)	



Tabla 16 . Análisis univariable de rechazo agudo vascular y SNPs de citoquinas (N=498).

	<i>Rechazo agudo vascular n (%)</i>	<i>OR (IC 95%)</i>	<i>p</i>
IL10 -1082G/-819C/-592C			
Portador GCC	55 (18,6)	0,81 (0,51-1,31)	0,403
No GCC	36 (21,8)	1	
TNFα -308A			
GA/AA	26 (34,7)	2,48 (1,44-4,29)	0,001
GG	64 (17,6)	1	
INFγ +874T			
AT/TT	60 (21,6)	0,99 (0,58-1,70)	0,966
AA	24 (21,8)	1	
IL18 -137G			
GG/GC	84 (19,8)	0,77 (0,32-1,87)	0,574
CC	7 (24,1)	1	

PRA: Panel de anticuerpos reactivos.

La potencia de nuestro estudio, teniendo en cuenta la frecuencia de los genotipos del TNF α , fue del 86%, con un error α de 0,05 y un β de 0,14.

En los casos de no asociación, se evaluó la potencia para poder concluir la bioequivalencia entre ambos grupos. Teniendo en cuenta nuestro tamaño muestral, se obtuvo una potencia del 80%, con un error α de 0,05 para detectar una bioequivalencia del 7%.



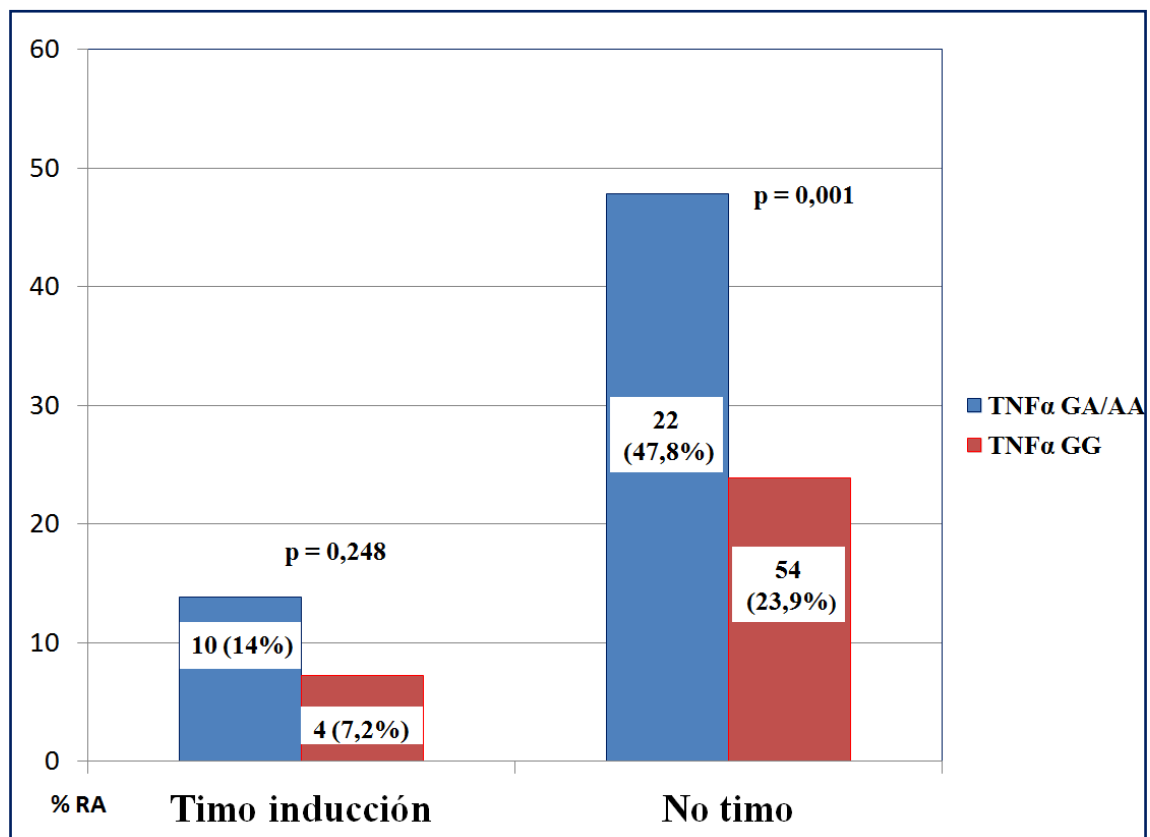


Figura 18. Asociación entre el polimorfismo del TNFα y la incidencia de rechazo agudo vascular cuando se estratifica para el tratamiento de inducción.

Tabla 17. Análisis multivariable de regresión logística de rechazo agudo vascular*.

	OR (IC 95%)	p
Inducción con timoglobulina		
Si	0,18 (0,09-0,34)	<0,001
No	1	
Función renal retardada		
Si	2,70 (1,16-4,50)	<0,001
No	1	
TNFα -308		
GA/AA	2,64 (1,46-4,76)	0,001
GG	1	
Edad receptor		
<60 años	1,67 (0,95-2,93)	0,073
≥60 años	1	

*Modelo ajustado para edad de donante, anticuerpos-HLA máximos y actuales e incompatibilidades HLA.



VII.3 Análisis univariable y multivariable para función renal retardada

Debido a que la FRR tiene una incidencia y unas consecuencias muy distintas en función de que se trate de un injerto procedente de un donante en asistolia o en muerte encefálica, analizamos las dos poblaciones por separado.

En los receptores que recibieron un injerto procedente de un donante en muerte encefálica (DME), los factores que se asociaron con mayor riesgo de FRR en el análisis univariable fueron: edad y sexo del donante, tiempo en diálisis del receptor y RAV (Tablas 18 y 19). De los SNPs evaluados, el TNF α -308 G/A fue el que mostró una mayor tendencia de asociación, aunque no alcanzó la significación estadística (OR=2,09; IC 95%: 0,81-5,38; p=0,119) (Tablas 18 y 19).

Para el análisis multivariable que evaluó el riesgo de desarrollar FRR en los pacientes con injertos procedentes de DME, las variables que se incluyeron en el modelo ajustado fueron aquellas que mostraron una asociación significativa en el análisis univariable: edad y sexo del donante, tiempo en diálisis del receptor, TNF α -308 G/A y el RAV. Además se incluyó el tiempo de isquemia fría, edad y sexo de receptor, PRA máximo, mismatch DR e inducción con timoglobulina, por su demostrada relevancia clínica para el evento. Los factores que demostraron una asociación independiente con mayor riesgo de FRR fueron: injertos de donantes >50 años (OR=6,16; IC 95%: 1,89-20,18; p=0,003), de sexo masculino (OR=5,24; IC 95%: 1,62-16,99; p=0,006), receptores portadores del alelo A (OR=6,15; IC 95%: 1,65-22,86; p=0,007), aquellos con una permanencia en diálisis previa al trasplante superior a 2 años (OR=5,47; IC 95%: 1,90-15,70; p=0,002) y los que presentaron un RAV (OR=5,30; IC 95%: 1,50-18,74; p=0,010) (Tabla 20).



Para el análisis univariable del riesgo de FRR en los receptores de injertos procedentes de donante en asistolia (DA) incluimos las mismas variables, añadiendo el tiempo de isquemia caliente (Tablas 21 y 22). Los factores que se relacionaron con mayor riesgo de FRR en estos pacientes fueron: tiempo en diálisis previo al trasplante >2 años, PRA máximo >0% y el SNP IL18 -137 G/C. Los pacientes portadores de los genotipos GG/GC tuvieron el triple de riesgo de FRR frente al genotipo CC, de menor producción de IL18 (OR=3,14; IC 95%: 1,19-8,24; p=0,015), como se representa gráficamente en la Figura 19. No se observó asociación significativa con el resto de SNPs evaluados.

El modelo de análisis multivariable para evaluar el riesgo de FRR en el caso de DA fue ajustado para las variables: tiempo en diálisis, PRA máximo e IL18 -137 G/C, edad y sexo de donante y receptor, mismatch DR, tiempo de isquemia fría y caliente, RAV y tratamiento inmunosupresor de inducción. Las únicas variables independientes que mantuvieron una asociación con mayor riesgo de FRR fueron: tiempo en diálisis >2 años (OR=2,42; IC 95%: 1,37-4,28; p=0,002) y portadores del alelo G para el SNP -137 G/G de la IL18 (OR=2,76; IC 95%: 1,03-7,40; p=0,042) (Tabla 23).



Tabla 18. Análisis univariable de *FRR* y características demográficas en receptores de injertos procedentes de *donantes en muerte encefálica* (N=186).

	<i>FRR</i> n (%)	<i>OR</i> (IC 95%)	<i>p</i>
Edad receptor			
< 60 años	21 (19,6)	1	0,601
≥ 60 años	18 (22,8)	1,20 (0,59-2,45)	
Edad donante			
< 50 años	15 (15)	1	0,031
≥ 50 años	24 (27,9)	2,19 (1,06- 4,52)	
Sexo receptor			
Hombre	23 (19)	0,71 (0,34-1,48)	0,370
Mujer	16 (24,6)	1	
Sexo donante			
Hombre	27 (27)	2,28 (1,07-4,84)	0,029
Mujer	12 (14)	1	
Tiempo en diálisis			
≤2 años	14 (12,2)	1	<0,001
> 2 años	24 (34,3)	3,76 (1,78-7,93)	
Causa exitus del donante			
Cardiovascular	28 (27,2)	2,30 (1,06-4,98)	0,031
Otras	11 (13,9)	1	
Tiempo de isquemia fría			
≤18 horas	6 (13,6)	1	0,154
>18 horas	33 (23,7)	1,97 (0,76-5,07)	



Tabla 19. Análisis univariable de *FRR*, inmunidad y SNPs en receptores de injertos procedentes de *donantes en muerte encefálica* (N=186).

	<i>FRR</i> n (%)	<i>OR</i> (IC 95%)	<i>p</i>
Timoglobulina en inducción			
Si	9 (25)	2,15 (1,49-3,11)	0,508
No	30 (20)	1	
PRA máximo			
0%	34 (20)	1	0,291
>0%	5 (31,3)	1,81 (0,59-5,58)	
Rechazo vascular			
Si	13 (43,3)	3,82 (1,65-8,82)	0,001
No	26 (16,7)	1	
IL10 -1082G/-819C/-592C			
Portador GCC	21 (19,4)	1,20 (0,52-2,76)	0,657
No GCC	10 (16,7)	1	
TNFα -308A			
GA/AA	8 (27,6)	2,09 (0,81-5,38)	0,119
GG	20 (15,4)	1	
IFNγ +874T			
AT/TT	22 (21,2)	1,93 (0,67-5,50)	0,212
AA	5 (12,2)	1	
IL18 -137G			
GG/GC	29 (18,6)	0,91 (0,18-4,52)	0,912
CC	2 (20)	1	



Tabla 20. Análisis multivariable de regresión logística de función renal retardada en pacientes que reciben un injerto de *donante en muerte encefálica* (N=186)*.

	OR (IC 95%)	p
Edad del donante		
<50 años	1	0,003
≥50 años	6,17 (1,89-20,18)	
Rechazo agudo vascular		
Si	5,30 (1,50-18,74)	0,010
No	1	
TNFα -308		
GA/AA	6,15 (1,65-22,86)	0,007
GG	1	
Tiempo en diálisis		
≤2 años	1	0,002
>2 años	5,47 (1,90-15,70)	
Sexo donante		
Hombre	5,24 (1,62-16,99)	0,006
Mujer	1	
Tiempo de isquemia fría		
≤18 horas	1	0,056
>18 años	3,46 (0,98-13,62)	

* Modelo ajustado para sexo y edad de receptor, inducción con timoglobulina, causa de exitus del donante, anticuerpos-HLA máximos y mismatch DR.



Tabla 21. Análisis univariable de *FRR* y características demográficas en pacientes con injertos procedentes de *donantes en asistolia* (N=312).

	<i>FRR</i> <i>n</i> (%)	<i>OR</i> (<i>IC</i> 95%)	<i>p</i>
Edad receptor			
< 60 años	141 (63,2)	1	0,611
≥ 60 años	59 (66,3)	1,14 (0,68-1,91)	
Edad donante			
< 40 años	67 (61,5)	1	0,477
≥ 40 años	133 (65,5)	1,19 (0,73- 1,92)	
Sexo receptor			
Hombre	136 (66,3)	1,32 (0,81-2,14)	0,254
Mujer	64 (59,8)	1	
Sexo donante			
Hombre	167 (65)	1,10 (0,59-2,05)	0,760
Mujer	32 (62,7)	1	
Tiempo en diálisis			
≤2 años	123 (58)	1	0,001
> 2 años	77 (77)	2,42 (1,41-4,15)	
Tiempo de isquemia caliente			
≤120 minutos	106 (66,7)	1,25 (0,79-1,99)	0,336
>120 minutos	94 (61,4)	1	
Tiempo de isquemia fría			
≤15 horas	33 (55,9)	1	0,152
>15 horas	166 (65,9)	1,52 (0,85-2,70)	



Tabla 22. Análisis univariable de FRR, inmunidad y SNPs en pacientes con injertos procedentes de *donantes en asistolia* (N=312).

	<i>FRR</i> <i>n</i> (%)	<i>OR</i> (<i>IC</i> 95%)	<i>p</i>
PRA máximo			
0%	185 (62,7)	1	0,033
>0%	15 (88,2)	4,45 (1,00-19,87)	
Timoglobulina en inducción			
Si	106 (66,7)	1,25 (0,79-1,99)	0,336
No	94 (61,4)	1	
Rechazo vascular			
Si	47 (70,1)	1,39 (0,77-2,50)	0,260
No	153 (62,7)	1	
IL10 -1082G/-819C/-592C			
Portador GCC	117 (61,9)	0,84 (0,51-1,39)	0,516
No GCC	69 (65,7)	1	
TNFα -308A			
GA/AA	30 (65,2)	1,14 (0,59-2,21)	0,692
GG	146 (62,1)	1	
IFNγ +874T			
AT/TT	110 (63,6)	1,12 (0,63-1,99)	0,693
AA	42 (60,9)	1	
IL18 -137G			
GG/GC	174 (64,7)	3,14 (1,19-8,24)	0,015
CC	7 (36,8)	1	



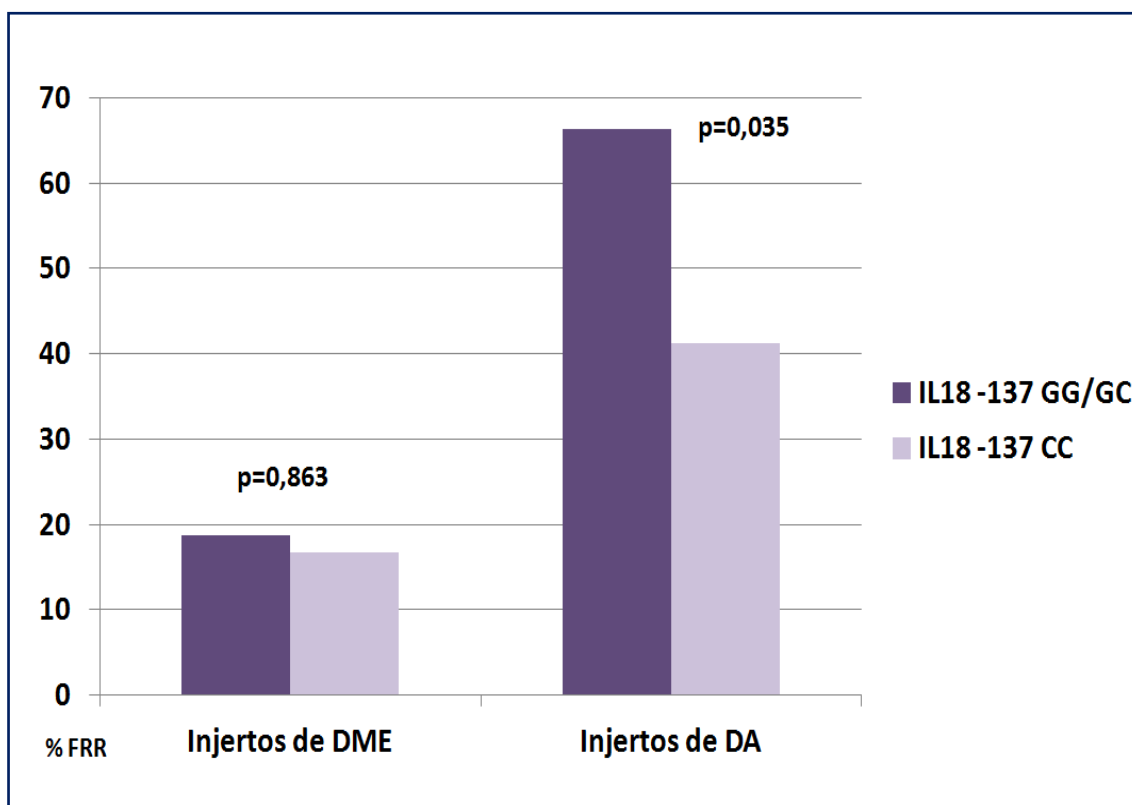


Figura 19. Asociación entre SNP IL18 -137 G/C y la incidencia de FRR cuando estratificamos a la población según el tipo de donante. DME=Donante en muerte encefálica, DA=Donante en asistolia.

Tabla 23. Análisis multivariable de regresión logística de función renal retardada en receptores con injerto de *donantes en asistolia**.

	OR (IC 95%)	p
Tiempo en diálisis		
≤2 años	1	0,002
>2 años	2,42 (1,37-4,28)	
IL18 -137		
GG/GC	2,76 (1,03-7,40)	0,042
CC	1	
PRA máximo		
0%	2,88 (0,62-13,35)	0,176
>0%	1	

*Modelo ajustado para edad y sexo de donante y receptor, mismatch DR, tiempo de isquemia fría y caliente, RAV y tratamiento inmunosupresor de inducción.



VII.4 Análisis para infección por CMV

Los resultados del análisis univariable con el evento infección por CMV se recogen en las tablas 24 y 25. Los factores relacionados con mayor riesgo de CMV fueron edad del receptor ≥ 60 años, presencia de RAV, FRR, tiempo de isquemia fría >18 horas y ser portador del alelo G para el SNP de IL18 G/C, mientras que la profilaxis con valganciclovir estuvo asociada a menor riesgo. Los factores con mayor fuerza de asociación fueron el RAV (OR=2,20; IC 95% 1,39-3,47; $p=0,001$) y el SNP -137 G/C de la IL18 (OR=2,90; IC 95% 1,08-7,79; $p=0,027$), ambos con un riesgo superior del doble de infección por CMV.

Estratificando la población estudiada en función de que reciba o no profilaxis con valganciclovir, se observa un importante y significativo descenso del riesgo de CMV en aquellos pacientes que además de recibir valganciclovir, presentan el genotipo CC de la IL18 -137 G/C (OR=0,63; IC 95%: 0,57-0,70; $p=0,004$) (Figura 20).

Aparte de las variables que obtuvieron una asociación significativa en el análisis univariable, se incluyeron en el modelo ajustado para evaluar riesgo de infección por CMV otras dos, mismatch HLA y grupo de riesgo de CMV (IgG CMV de donante positiva, receptor negativa), por ser variables de relevancia clínica bien documentada. Todas las variables incluidas, a excepción de mismatch HLA, mostraron una asociación independiente con el riesgo de CMV (Tabla 26). Los portadores del alelo G para el SNP -137 G/C de la IL18 siguió mostrando un riesgo casi tres veces mayor de desarrollar infección por CMV (OR=2,79; IC 95%: 1,00-7,78; $p=0,05$) frente al genotipo CC (Tabla 26).



Tabla 24. Análisis univariable de infección por CMV y características demográficas (N=498).

	<i>Infección por CMV n (%)</i>	<i>OR (IC 95%)</i>	<i>p</i>
Edad receptor			
< 60 años	73 (44,5)	1	0,026
≥ 60 años	110 (34,2)	1.54 (1.05-2.27)	
Sexo receptor			
Hombre	121 (37,9)	1,03 (0,70-1,52)	0,862
Mujer	62 (37,1)	1	
Edad donante			
< 60 años	166 (37,1)	0,76 (0,39- 1,48)	0,425
≥ 60 años	17 (43,6)	1	
Tiempo en diálisis			
≤2 años	123 (38,8)	1	0,426
> 2 años	59 (35,1)	0,85 (0,57-1,26)	
Profilaxis Valganciclovir			
Si	78 (32,6)	0,64 (0,44-0,93)	0,020
No	105 (42,9)	1	
Donante +/-Receptor -			
Si	30 (43,5)	1,31 (0,78-2,19)	0,303
No	152 (37)	1	
Timoglobulina			
Si	109 (40,5)	1,31 (0,90-1,90)	0,147
No	74 (34,1)	1	



Tabla 25. Análisis univariable de infección por CMV, inmunidad y SNPs (N=498).

	<i>Infección por CMV n (%)</i>	<i>OR (IC 95%)</i>	<i>p</i>
Mismatch HLA			
≤3	181 (38,3)	1	0,092
>3	2 (15,4)	3,42 (0.75-15.61)	
Tiempo de isquemia fría			
≤18 horas	76 (32,9)	1,51 (1,04-2,19)	0,029
>18 horas	106 (42,6)	1	
Función renal retardada			
Si	102 (43,4)	1,61 (1,11-2,32)	0,011
No	81 (32,3)	1	
Rechazo vascular			
Si	50 (53,2)	2,20 (1,39-3,47)	0,001
No	133 (34)	1	
IL10 -1082G/-819C/-592C			
Portador GCC	107 (36,5)	0,92 (0,62-1,37)	0,698
No GCC	61 (38,4)	1	
TNFα -308A			
GA/AA	31 (41,9)	1,25 (0,75-2,08)	0,385
GG	130 (36,5)	1	
IFNγ +874T			
AT/TT	110 (40,7)	1,19 (0,75-1,90)	0,442
AA	39 (36,4)	1	
IL18 -137G			
GG/GC	161 (38,7)	2,90 (1,08-7,79)	0,027
CC	5 (17,9)	1	



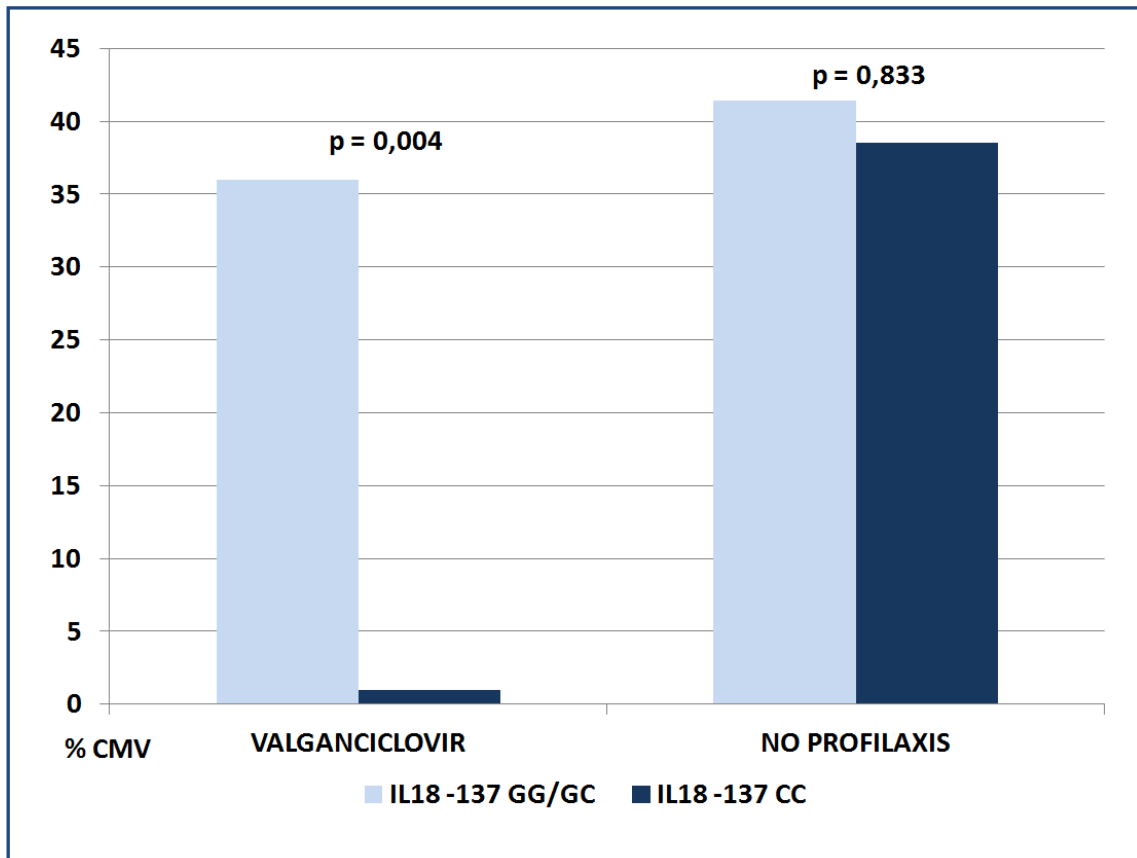


Figura 20. Asociación entre SNPs de IL18 -137 G/C e infección por CMV, según reciban o no profilaxis con valganciclovir.



Tabla 26. Análisis multivariable de infección por CMV.

	OR (IC 95%)	p
IGG CMV		
D+/R-	5,18 (1,83-14,65)	0,002
D-/R+ & D+/R+	1	
Timoglobulina		
Si	4,25 (1,31-13,72)	0,016
No	1	
Profilaxis con Valganciclovir		
Si	0,15 (0,04-0,54)	0,004
No	1	
Mismatch HLA		
≤3	3,13 (0,57-17,13)	0,188
>3	1	
IL18 -137		
GG/GC	2,79 (1,01-7,78)	0,049
CC	1	
Rechazo agudo vascular		
Si	2,63 (1,55-4,45)	<0,001
No	1	
Edad de receptor		
<60 años	1	0,014
≥60 años	1,73 (1,11-2,69)	
Tiempo de isquemia fría		
≤18 horas	1	0,022
>18 horas	1,64 (1,07-2,50)	
Función renal retardada		
Si	1,63 (1,06-2,51)	0,026
No	1	



Tabla 27. Análisis univariable de infección por BK y características demográficas (N=498).

	<i>Infección por BK n (%)</i>	<i>OR (IC 95%)</i>	<i>p</i>
Edad receptor			
< 60 años	28 (8,5)	1,20 (0,59-2,43)	0,602
≥ 60 años	12 (7,1)	1	
Sexo receptor			
Hombre	28 (8,6)	1,25 (0,62-2,53)	0,529
Mujer	12 (7)	1	
Edad donante			
< 60 años	34 (7,4)	0,45 (0,17- 1,15)	0,091
≥ 60 años	6 (15)	1	
Tiempo en diálisis			
≤2 años	20 (6,1)	1	0,047
> 2 años	19 (11,2)	1,93 (1,00-3,72)	
Mismatch			
≤3	0 (0)	1	0,280
>3	40 (8,3)	0,917 (0,89-0,94)	
Tiempo de isquemia fría			
≤18 horas	19 (8)	1,08 (0,55-2,09)	0,814
>18 horas	19 (7,5)	1	
Timoglobulina			
Si	21 (11)	1,87 (0,97-3,58)	0,055
No	19 (6,2)	1	



Tabla 28. Análisis univariable de infección por BK, eventos clínicos y SNPs (N=498).

	<i>Infección por BK n (%)</i>	<i>OR (IC 95%)</i>	<i>p</i>
Infección CMV			
Si	13 (7,1)	0,78 (0,39-1,55)	0,482
No	27 (8,9)	1	
Función renal retardada			
Si	20 (8,4)	1,09 (0,57-2,08)	0,791
No	20 (7,7)	1	
Rechazo vascular			
Si	9 (9,3)	1,21 (0,55-2,65)	0,620
No	31 (7,8)	1	
IL10 -1082G/-819C/-592C			
Portador GCC	25 (8,4)	1,28 (0,61-2,68)	0,501
No GCC	11 (6,7)	1	
TNFα -308A			
GA/AA	5 (6,7)	0,86 (0,32-2,30)	0,764
GG	28 (7,7)	1	
IFNγ +874T			
AT/TT	6 (7,5)	1,16 (0,45-3,00)	0,754
AA	20 (6,5)	1	
IL18 -137G			
GG/GC	33 (7,8)	0,73 (0,21-2,53)	0,619
CC	3 (10,3)	1	



Tabla 29. Análisis multivariable de infección por BK.

	OR (IC 95%)	p
Timoglobulina		
Si	1,81 (0,93-3,53)	0,080
No	1	
Tiempo en diálisis		
≤2 años	1	0,097
>2 años	1,76 (0,90-3,43)	

*Modelo ajustado para edad de donante y receptor, mismatch DR, tiempo de isquemia fría, FRR y RAV.

VII.5 Análisis para infección por BK

En el análisis univariable, únicamente un tiempo en diálisis >2 años se asoció con mayor riesgo de infección por poliomavirus BK (OR=1,93; IC 95% 1,00-3,72; p=0,047). La inducción con timoglobulina mostró una tendencia de mayor riesgo, sin alcanzar la significación estadística (OR=1,87; IC 95% 0,97-3,58; p=0,055). Ambas variables no mostraron una asociación independiente con mayor riesgo de infección por BK, cuando el modelo fue ajustado para éstas y otras variables documentadas en la literatura, que fueron: edad de donante y receptor, mismatch DR, tiempo de isquemia fría, FRR y RAV.



Tabla 30. Análisis univariable de pérdida del injerto y características demográficas (N=498).

	<i>HR</i>	<i>IC 95%</i>	<i>p</i>
Edad receptor			
< 60 años	1		
≥ 60 años	1,26	0,69-2,31	0,443
Sexo receptor			
Hombre	0,99	0,53-1,85	0,992
Mujer	1		
Edad donante			
< 60 años	1		
≥ 60 años	1,54	0,37-6-36	0,550
Sexo donante			
Hombre	1,49	0,71-3,10	0,284
Mujer	1		
Tiempo en diálisis			
≤2 años	0,95	0,49-1,82	0,888
> 2 años	1		
Tipo de donante			
Asistolia	1,27	0,68-2,37	0,442
Muerte encefálica	1		
Mismatch DR			
≤1	1		
2	1,26	0,70-2,27	0,427
Timoglobulina en inducción			
Si	1		
No	1,05	0,54-2,05	0,867



Tabla 31. Análisis univariable de pérdida del injerto, inmunidad y eventos (N=498).

	<i>HR</i>	<i>IC 95%</i>	<i>p</i>
PRA máximo			
0%	1		
>0%	1,46	0,57-3,70	0,426
PRA actual			
0%	1		
>0%	1,93	0,46-8,00	0,362
Rechazo agudo celular			
Si	1,49	0,63-3,53	0,360
No	1		
Rechazo agudo vascular			
Si	2,74	1,51-4,97	0,001
No	1		
Rechazo agudo humoral			
Si	2,82	1,19-6,69	0,018
No	1		
Función renal retardada			
Si	1,48	0,82-2,67	0,187
No	1		
Infección CMV			
Si	1,45	0,79-2,67	0,222
No	1		
Infección BK			
Si	3,25	1,50-7,02	0,003
No	1		



Tabla 32. Análisis univariable de pérdida del injerto y SNPs (N=498).

	HR	IC 95%	p
IL10 -1082G/-819C/-592C			
Portador GCC	0,52	0,23-1,16	0,112
No GCC	1		
TNFα -308A			
GA/AA	1,75	0,78-3,88	0,168
GG	1		
INFγ +874T			
AT/TT	2,08	0,80-5,40	0,133
AA	1		
IL18 -137G			
GG/GC	0,72	0,22-2,36	0,593
CC	1		

VII.6 Análisis de supervivencia de injerto

Tanto en el análisis univariable como en el modelo ajustado (para edad de donante y receptor, incompatibilidades HLA, tiempo en diálisis, tratamiento inmunosupresor, FRR, RAV, RAH, infección por CMV y BK), solo los eventos de RAV (OR=2,56; IC 95% 1,40-4,68; p=0,018) e infección por BK (OR=3,06; IC 95% 1,34-6,99; p=0,008) demostraron asociarse con un mayor riesgo de pérdida del injerto. El RAH mostró una relación significativa en el univariable, que no se confirmó en el multivariable (Tablas 31, 32 y 33). Ninguno de los SNPs evaluados se asoció significativamente con la supervivencia del injerto (Figuras 21, 22, 23 y 24).



Tabla 33. Análisis multivariable de cox para pérdida del injerto*.

	HR (IC 95%)	p
Infección por virus BK		
Si	3,06 (1,34-6,99)	0,008
No	1	
Rechazo agudo vascular		
Si	2,56 (1,40-4,68)	0,018
No	1	
Rechazo agudo humoral		
Si	2,07 (0,80-5,34)	0,132
No	1	

*Modelo ajustado para edad de donante y receptor, incompatibilidades HLA, tiempo en diálisis y tratamiento inmunosupresor de inducción y mantenimiento.

Sin embargo, si analizamos la supervivencia del injerto según el tipo de donante, los resultados son ligeramente distintos. En el caso de los injertos renales procedentes de DME, los factores de riesgo de pérdida del injerto fueron RAV, RAH, FRR y edad del receptor ≥ 60 años (Tabla 34), mientras que para los trasplantes renales de DA, el principal factor de riesgo fue la infección por poliomavirus BK (Tabla 35).

Comparando las causas de pérdida del injerto en ambas poblaciones, hay que destacar dos puntos:

1. La presencia de FRR en los injertos procedentes de DA no influye en la supervivencia, mientras que supone un riesgo de pérdida del injerto superior a 4 veces en el caso de los DME (HR=4,26; IC: 1,49-12,14, p=0,001).
2. La infección por BK es un factor de riesgo de pérdida del injerto solo en los injertos renales de DA (HR=4,86, IC: 1,94-12,16), p=0,001).



Tabla 34. Análisis multivariable de cox para pérdida del injerto *en el caso de donantes en muerte encefálica**.

	HR (IC 95%)	p
Rechazo agudo vascular		
Si	4,43 (1,38-14,21)	0,012
No	1	
Función renal retardada		
Si	4,26 (1,49-12,14)	0,007
No	1	
Edad del receptor		
<60 años	1	0,047
≥60 años	3,13 (1,01-9,65)	
Rechazo agudo humoral		
Si	3,60 (0,88-14,64)	0,073
No		

*Modelo ajustado para edad de donante, incompatibilidades HLA, tiempo en diálisis y tratamiento inmunosupresor de inducción y mantenimiento.

Tabla 35. Análisis multivariable de cox para pérdida del injerto *en el caso de donantes en asistolia**.

	HR (IC 95%)	p
Infección por BK		
Si	4,86 (1,94-12,16)	0,001
No	1	
Rechazo agudo vascular		
Si	1,70 (0,78-3,74)	0,180
No	1	
Función renal retardada		
Si	0,67 (0,31-1,46)	0,321
No	1	

*Modelo ajustado para edad de donante y receptor, incompatibilidades HLA, tiempo en diálisis y tratamiento inmunosupresor de inducción y mantenimiento.



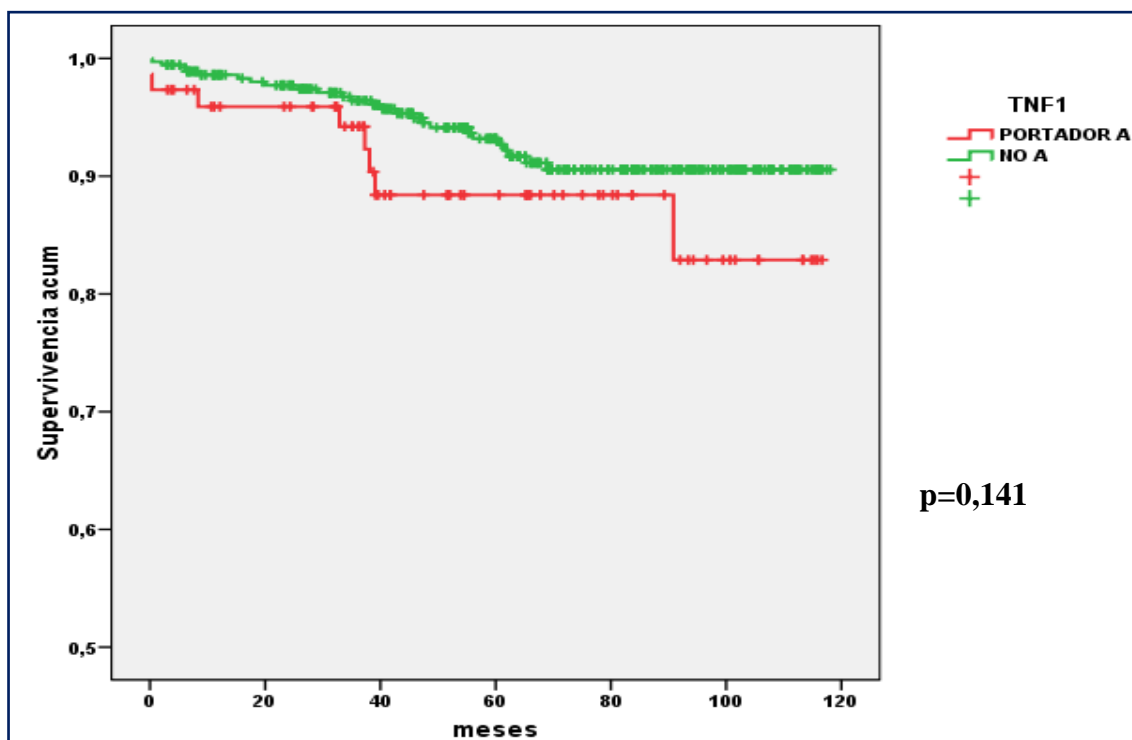


Figura 21. Supervivencia del injerto según SNP TNF α -308A/C.

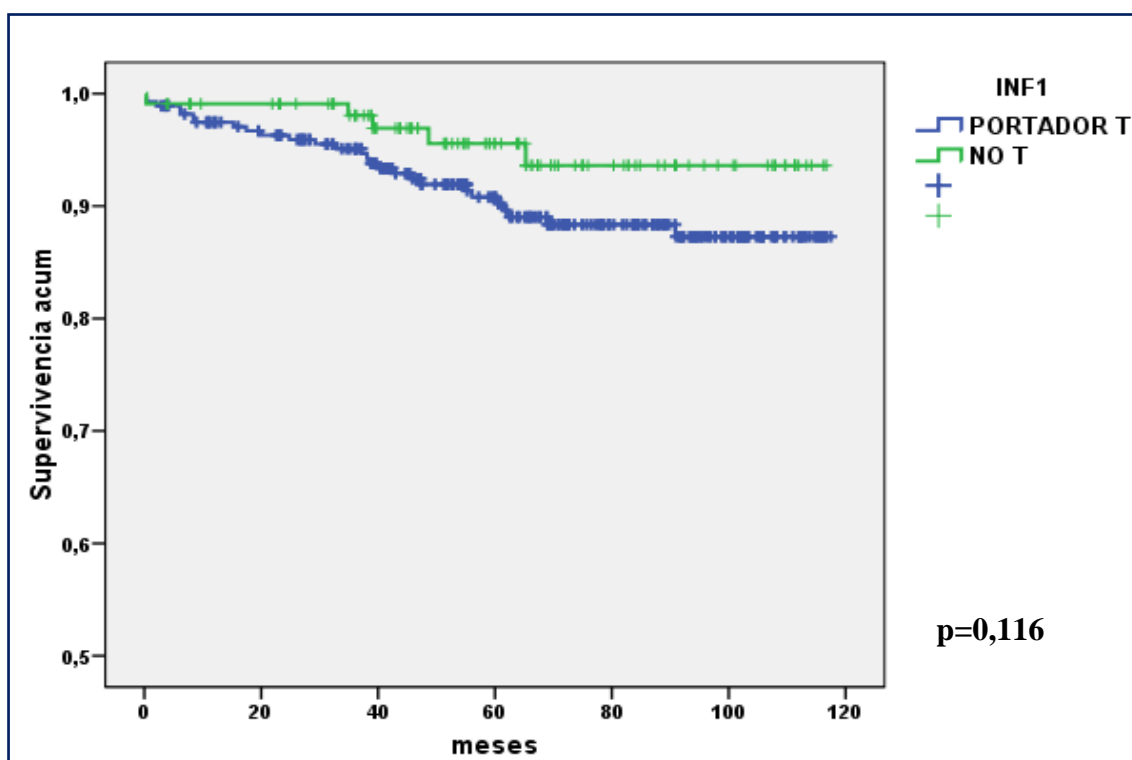


Figura 22. Supervivencia del injerto según IFN γ +874 T/A.



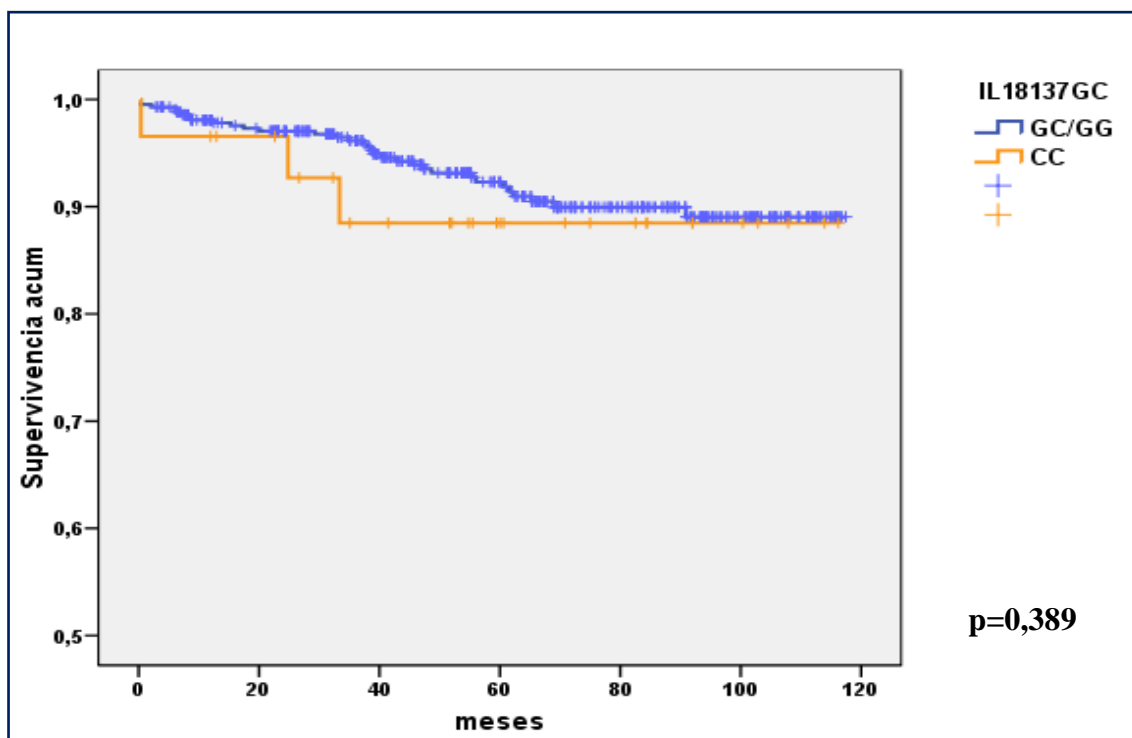


Figura 23. Supervivencia del injerto según SNP IL18G/C.

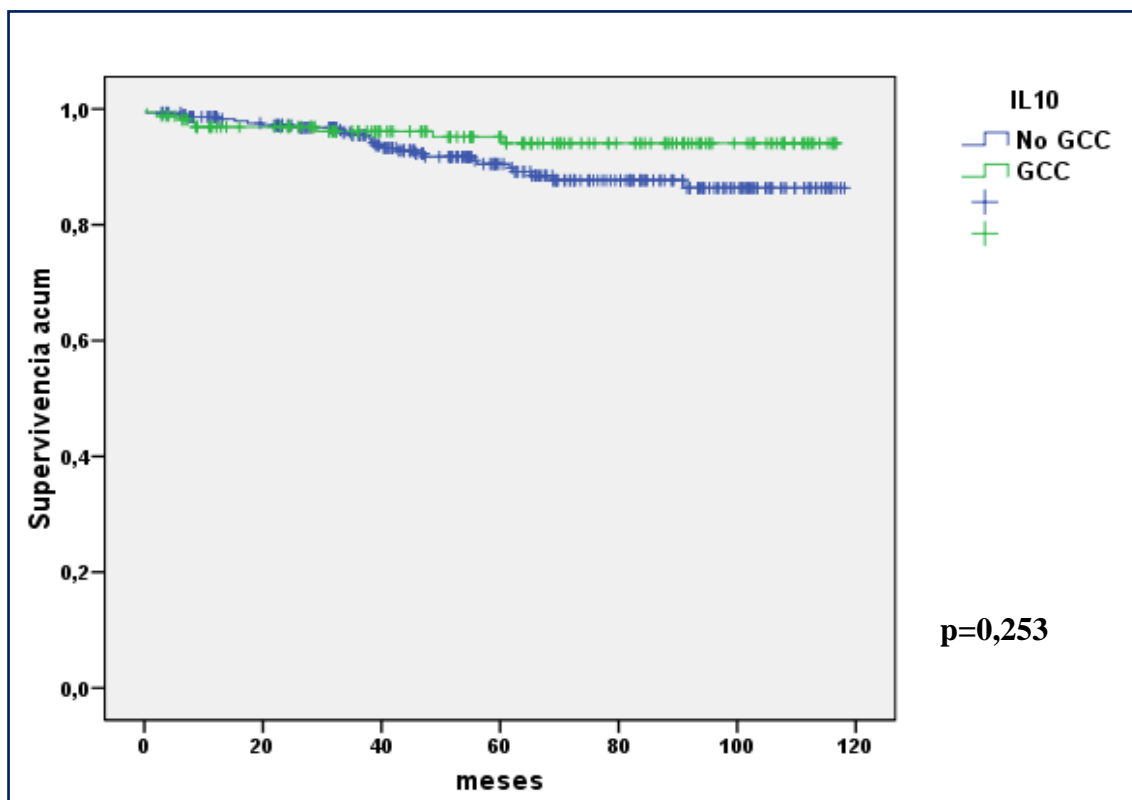


Figura 24. Supervivencia del injerto según SNPs IL10.



VIII DISCUSSION



El éxito del trasplante de órganos sólidos en general y, más específicamente, del trasplante renal, depende de factores bien documentados en la literatura, relacionados con características de donante y receptor y del propio proceso de la donación. La edad, raza y comorbilidad previa, junto con la incompatibilidad HLA entre donante y receptor y presencia de anticuerpos preformados, pueden jugar un papel clave en el riesgo de rechazo agudo y comprometer la supervivencia del injerto, tanto a corto como a largo plazo^{8, 73, 74}. Sin embargo, el impacto que todos estos factores tienen en los resultados del trasplante, en muchas ocasiones, es muy variable. Esta variabilidad puede ser debida a la presencia de factores genéticos, que modulen la alorrespuesta inmune a través de la mayor o menor expresión de distintas citoquinas⁷⁵.

La respuesta inmune a antígenos extraños está influenciada por el microambiente local en el que acontece, en el cual las citoquinas juegan un papel determinante. Estas proteínas son fundamentales en la activación, diferenciación y proliferación celular. Además, interactúan entre sí formando una compleja red biológica de señalización, que regula y dirige la respuesta inmune ante cualquier estímulo. Por tanto, polimorfismos genéticos que alteren su producción pueden cambiar la evolución del trasplante renal e influir en los resultados. El conocimiento previo de los mismos puede ayudarnos a individualizar tipo y dosis de inmunosupresión, intentando evitar así sus efectos secundarios.

En esta línea, son varios los autores que han investigado el impacto de los SNPs de diversas citoquinas en la incidencia de RA y FRR en el trasplante renal, con resultados muy dispares.



VIII.1 SNP del TNF α -308 G/T

De entre todas las citoquinas estudiadas, el TNF α y el polimorfismo situado en la posición -308 G/A, es el que el que acumula mayor número de series en la literatura y el que más ampliamente se ha investigado en relación con el trasplante. Se han descrito concentraciones séricas elevadas de TNF α durante el proceso de RA tanto en trasplante hepático^{76, 77}, cardíaco⁷⁸ como renal^{79, 80}. Además se ha detectado la presencia de ésta y otras citoquinas en biopsias de injertos renales, en relación con otros hallazgos histológicos de rechazo agudo y crónico⁸¹; con una marcada sobreexpresión del receptor tipo 2 del TNF α , tanto a nivel experimental como en humanos⁸².

Desde el descubrimiento de este polimorfismo y sus implicaciones funcionales a finales de la década de los 90^{56, 57}, diversos autores han intentado buscar una asociación del mismo con los resultados del trasplante renal. La mayoría se centra en la posible relación con la incidencia de RA, existiendo menos casos que busquen una asociación con el riesgo de FRR, supervivencia del injerto o infecciones virales relacionadas.

VIII.1.1 Asociación con rechazo agudo

Con respecto al RA, los datos de la literatura son bastante contradictorios. Existen varios estudios que han observado una asociación entre el SNP -308 G/A del TNF α y el riesgo de RA⁸³⁻⁹⁵, mientras que otros autores no han conseguido demostrar la existencia de una relación significativa⁹⁶⁻¹⁰². Uno de los principales problemas, es que no existe un acuerdo sobre si es necesario estudiar el polimorfismo en los donantes, en los receptores o en ambos. Hay algunos autores que han considerado el efecto neto derivado de ambos, donante y receptor, pero los resultados son poco consistentes. De cualquier modo, consideramos que el genotipado clave es el del receptor, dado que las citoquinas que juegan un papel predominante en la respuesta inmune son secretadas por linfocitos y macrófagos del receptor.



En un meta-análisis publicado en 2011, Hu et al concluyeron que existía una posible asociación entre el SNP -308G/A del TNF α de los receptores y el RA, pero que eran necesarios estudios mejor diseñados y con mayor tamaño muestral para poder verificar esos hallazgos¹⁰³.

La discrepancia en los resultados obtenidos puede estar en relación con una falta de homogeneidad de las poblaciones estudiadas, la presencia de sesgos de selección y un número pequeño de casos, que conlleva una potencia estadística insuficiente para detectar el efecto.

Nuestro estudio confirma que los trasplantados renales portadores del genotipo GA/AA tienen casi tres veces más riesgo de RAV que aquellos con el genotipo GG. Se trata del primer estudio de cohortes con un amplio número de casos, que incluye trasplantes renales consecutivos y en el que el evento RAV está constatado histológicamente en todos los casos. Las variables han sido extraídas de una base de datos prospectiva y la población está muy controlada, con evaluaciones periódicas frecuentes en la consulta, de forma que no existe ninguna pérdida de seguimiento. Además, se trata de una población muy homogénea, donde los retrasplantes y los de raza distinta a la caucásica fueron excluidos. Las frecuencias genotípicas de la población sana que utilizamos como control, se ajustaron a lo esperado según el equilibrio de Hardy-Weinberg (EHW).

En la tabla 36, se enumeran los estudios de la literatura considerados más relevantes por la inclusión de un mayor número de casos, en los que se ha investigado una posible asociación entre el SNP -308 G/A de TNF α y el riesgo de RA. A pesar de este criterio de selección, solo 7 de 20 incluían más de 200 pacientes^{83, 85, 97-99, 101, 102}.



Tabla 36. Estudios más relevantes publicados sobre relación entre TNF α -308 G/A y RA.

Autor	Año	Raza	Caso/control	Biopsia	EHW	Relación
Dhaouadi T	2013	Caucásica	80/151	No	ND	Si
Azarpira N	2009	Asiática	46/54	No	No	No
Grinyo J	2008	Caucásica	62/160	Si	No	Si
Manchada P	2008	Asiáticos	18/82	Si	No	Si
Brabcova I	2007	Caucásica	190/246	No	Si	No
Breulmann B	2007	Caucásica	115/109	Si	ND	No
Gendzekhadze K	2006	Mixta	30/33	Si	No	No
Pawlik A	2005	Caucásica	25/57	Si	Si	Si
Dmitrienko S	2005	Caucásica	50/50	Si	No	No
Tinckam K	2005	Mixta	ND/ND (118)	No	ND	Si
Park JY	2004	Asiáticos	151/13	Si	Si	Si*
Wramner LG	2004	Caucásica	78/79	No	ND	Si**
Alakulppi NS	2004	Caucásica	122/772	No	ND	No
Lee H	2004	Caucásica	140/277	No	Si	Si*
McDaniel DO	2003	Afroam.	13/77	No	Si	No
Hahn AB	2001	Mixta	32/88	Si	ND	Si*
Pelletier R	2000	Mixta	33/68	Si	ND	Si
Poli F	2000	Caucásica	92/77	Si	ND	Si**
Marshall SE	2000	Caucásica	114/95	No	Si	No
Sankaran D	1999	Caucásica	74/21	No	ND	Si*

Relación=asociación entre SNP de TNF α -308 G/A y RA, *solo encontrada relación en receptores con incompatibilidad DR, **solo con severidad de RA. Biopsia=método diagnóstico de RA en el 100% de los casos. EHW=equilibrio de Hardy-Weinberg. ND=datos no disponibles.



Además, es importante resaltar que la mayoría de estos estudios o no mostraba los datos de las frecuencias genotípicas en población sana o en el caso de disponer de ellas, no se encontraban en equilibrio, según el EHW. Solo 6 estudios incluían todos los datos y no se desviaban del EHW^{89, 97, 101, 102, 104, 105}, como ocurre en nuestra población.

Otro punto clave es el diseño del estudio, de forma que pocas series, a diferencia de la nuestra, se basaron en una cohorte, que incluyera a los pacientes que hubieran recibido un trasplante renal durante un periodo específico de tiempo^{83, 92, 97, 98, 101}. El estudio de casos-control llevado a cabo por Dmitrienko et al, por ejemplo, estaba limitado por su diseño; con un bajo nivel de evidencia científica y resultados potencialmente sesgados debido a la selección de los controles¹⁰⁰. Además, un diseño en forma de caso-control implica que, aceptando un error α de 0,05 y un β de 0,2 para un contraste de dos colas, sería necesaria una muestra de 154 casos y 154 controles para detectar una odds ratio mínima de 2. La ausencia de descripción de los criterios de selección en otros estudios, también podría implicar la existencia de sesgos, teniendo en cuenta que la mayoría son cortes transversales de la población.

Por otro lado, variaciones étnicas también pueden hacer que las frecuencias de los SNPs sean distintas. Azarpira et al detecta en la población iraní una frecuencia del genotipo GG del 2%⁹⁶, mientras que en India, Manchanda et al describe que este mismo genotipo se encuentra en el 32% de los pacientes⁸⁷. Sin embargo, en la población caucásica, GG es el genotipo más frecuente, oscilando entre un 60 y un 89% dependiendo de los estudios^{83, 91-93}. Varios autores no tienen en cuenta estas diferencias e incluyen diferentes razas en sus series, por lo que los resultados no pueden ser concluyentes.



Muchos estudios evalúan poblaciones poco homogéneas, porque incluyen un alto porcentaje de pacientes hiperinmunizados o retrasplantados^{83, 86, 93, 97, 98, 101, 106}, ambos con mayor riesgo de rechazo, que pueden alterar sensiblemente los resultados. El polimorfismo evaluado puede no tener el mismo peso en los pacientes que han recibido un trasplante previo, debido a que existe una mayor predominancia del componente humoral en el desencadenante del rechazo. De todas formas, la inclusión de pacientes con PRA positivo puede ser válida, siempre que se incluya en el análisis que evalúe el riesgo de rechazo, lo que no tienen en cuenta todos los autores.

Otra variable que se relaciona con la incidencia de rechazo y que siempre hay que considerar es la terapia inmunosupresora. En la mayor parte de las series publicadas, el eje de la inmunosupresión se basa en el tratamiento con ciclosporina^{83, 85-87, 89, 92, 95, 98, 100, 101, 106}, un fármaco cada vez menos utilizado hoy en día; incluso existen estudios con azatioprina^{87, 89, 90, 92, 102}, molécula que desde hace más de 8-10 años ha sido sustituida por micofenolato. Todos nuestros pacientes, a excepción de 2 que recibieron un imTOR, estaban en tratamiento con tacrolimus, micofenolato y esteroides y las poblaciones resultantes de la estratificación por los genotipos de mayor y menor producción de TNF α (AA/GA versus GG) fueron idénticas para todas las variables, excepto en la existencia de una mayor incidencia de RAV para el genotipo mayor productor.

Además, en las series de la literatura existe un bajo porcentaje de terapia de inducción, reduciendo el uso de timoglobulina a los casos de pacientes hiperinmunizados o de raza negra^{86, 97, 98}. Sin embargo, la mayoría de los autores no incluyen la terapia inmunosupresora en el análisis y pueden existir discrepancias en el impacto que los genotipos estudiados tienen en el riesgo de RA en función del tratamiento aplicado. En nuestro estudio, observamos una interacción significativa entre



el tratamiento de inducción con timoglobulina y el polimorfismo del TNF α (Figura 18). **Los portadores del alelo A que no recibieron timoglobulina de inducción, tuvieron mayor riesgo de RAV que los no portadores, sugiriendo que el uso de triple terapia convencional con tacrolimus, micofenolato y esteroides, puede ser insuficiente para bloquear la secreción de TNF α en los portadores del haplotipo de mayor producción.** La inducción con timoglobulina puede ayudar a inhibir de forma más eficaz la respuesta th1 generada en la alorrespuesta inmune y, por tanto, controlar la síntesis de TNF α que contribuye a perpetuar y amplificar la inflamación generada^{107, 108}.

En relación con lo anteriormente descrito, la incidencia de RA es muy diferente según los estudios, oscilando entre el 17%⁸³ y el 63%⁹². Además, en casi la mitad de las series, los episodios de RA no estaban constatados histológicamente en todos los casos (Tabla 36); existen estudios en los que el diagnóstico de rechazo se hizo en base a criterios clínicos. En un intento evitar sesgos en este sentido, en nuestro estudio utilizamos como "end point" primario la variable RAV, dado que todos los episodios estaban confirmados mediante biopsia y además eran rechazos más severos. En nuestro análisis, **aunque no encontramos una asociación con la existencia de RA** (datos no mostrados), como es el caso de algunos autores, **si la hallamos con los rechazos más severos**. Sin embargo, solo se describen dos estudios en la literatura que correlacionen los genotipos del TNF α con la severidad del rechazo, uno desde el punto de vista histológico⁹¹ y otro por la respuesta al tratamiento (rechazo agudo corticorresistente)⁹⁵. En otra serie, Park et al⁸⁹ analizan la posible asociación de polimorfismos genéticos con el rechazo agudo recurrente, encontrando que los pacientes de mayor riesgo son aquellos con el genotipo de mayor producción de TNF α , combinado con el de menor producción de TGF β 1 (50% vs 4%, p=0,001). En nuestro trabajo, no encontramos



ninguna relación del SNP del TNF α con el número de rechazos por paciente (datos no mostrados).

VIII.1.2 Función renal retardada

La búsqueda de una posible asociación con la presencia de FRR está mucho menos explorada. Solo tres autores en la literatura han evaluado la incidencia de FRR según el SNP -308 del TNF α , dos de ellos genotipando al donante y uno al receptor.

McDaniel et al¹⁰⁴ determinaron la frecuencia de los genotipos de SNPs de distintas citoquinas en una población de 77 pacientes trasplantados renales afroamericanos, estratificándolos en tres grupos según la presencia de RA (n=13), FRR (n=29) o función renal estable (n=41) y los compara con un grupo control. Tras el análisis de los datos, no encontraron diferencias estadísticamente significativas según el SNP del TNF α , pero el pequeño número de casos hace que sus resultados no puedan ser concluyentes. Además, al tratarse de pacientes de raza distinta a la caucásica, los resultados no son extrapolables a nuestra población.

En nuestro estudio, **en el grupo de pacientes que recibieron un injerto de donante en muerte encefálica**, el genotipo de mayor producción (GA/AA) mostró una tendencia de mayor riesgo de FRR en el análisis univariable, que se confirmó en el modelo de regresión logística ajustado para el resto de variables. **Los pacientes con el genotipo de mayor producción mostraron hasta 6 veces más riesgo de FRR (OR=6,15; IC 95%: 1,65-22,86; p=0,007) que aquellos con el genotipo GG.** Como ya se ha descrito en la lesión por isquemia-reperfusión, el estímulo de la respuesta inmune por la liberación de material intracelular tras la apoptosis, conlleva la secreción de citoquinas proinflamatorias que, como el TNF α , promueven la respuesta inflamatoria³⁹.



Así, pacientes portadores de los genotipos de mayor producción de TNF α , podrían tener mayor riesgo y severidad del daño por isquemia-reperfusión.

VIII.1.3 Relación con resultados a largo plazo y supervivencia del injerto

Son varios los estudios que analizaron la asociación entre el SNP -308 del TNF α y la nefropatía crónica del injerto^{88, 105, 109}. Sin embargo, los resultados no fueron muy concluyentes dado que la definición de nefropatía crónica estaba basada en criterios clínicos muy dispares. Además, es un término que hoy en día ha quedado en desuso porque engloba patologías de muy diversa etiología. Destacar el estudio de Nikolova et al⁸⁸, en el que genotiparon a 28 donantes y 46 receptores y objetivaron una mayor frecuencia del genotipo GA en los donantes que posteriormente desarrollaron nefropatía crónica frente a los que mantuvieron una función renal estable (75% vs 16,7%, $p=0,002$). En el caso del genotipo del receptor, las diferencias fueron estadísticamente significativas solo en el caso de incompatibilidad DR (16% vs 0%, $p=0,012$). El principal problema de esta serie, es el tamaño muestral y la ausencia de descripción de los criterios de selección del grupo control y las frecuencias genotípicas esperadas.

En cuanto a la supervivencia del injerto, en nuestro estudio no objetivamos diferencias según los genotipos de mayor o menor producción de TNF α , aunque se observó una **tendencia no significativa de peor supervivencia en el caso de los portadores del alelo A**. Sin embargo, Wramner et al⁹⁵, aunque no objetivaron diferencias en la supervivencia globalmente, al estratificar por la presencia de rechazo, comprobaron que aquellos que habían tenido un RA y además eran portadores del genotipo AA, tenían peor supervivencia (48% vs 60% a 10 años, $p<0,02$). Este subanálisis también fue realizado en nuestra población, no encontrándose diferencias significativas (datos no mostrados). Otros autores, tras analizar una serie amplia del



registro europeo CTS (Collaborative Transplant Study group), no encontraron ninguna asociación para el caso de primeros trasplantes, pero si para los retrasplantes, de forma que los portadores del genotipo AA tuvieron peor supervivencia que el resto de genotipos¹¹⁰.

VIII.1.4 Incidencia de infecciones virales

Aunque se ha descrito un efecto protector del TNF α frente a las infecciones virales, **en nuestra serie no hemos objetivado ninguna asociación entre su polimorfismo y la incidencia de infección por CMV o BK** (Tablas 24 y 25). Tras una revisión de la literatura científica, no hemos encontrado ningún estudio que evalúe la asociación entre el SNP del TNF α y el virus BK. En el caso de la infección por CMV, hemos hallado cuatro artículos, dos en trasplante pulmonar^{111, 112}, uno en cardiaco¹¹³ y otro en renal¹¹⁴. En ninguno de ellos se encuentra una relación significativa entre el SNP -308 A/G del TNF α y la incidencia de infección por CMV.

VIII.2 SNPs de IL10 -1082G/-819C/-592C

La IL10 es una proteína antiinflamatoria, que además ha sido relacionada con mecanismos de inmunotolerancia. El haplotipo GCC se ha asociado con mayor producción de IL10, mientras que los portadores de ATA son los menor expresión^{66, 67, 115, 116}. Teóricamente, los pacientes que fueran portadores de polimorfismos asociados a mayor síntesis de IL10, tendrían menos riesgo de presentar un episodio de RA. Sin embargo, los estudios publicados hasta la fecha han mostrado resultados muy dispares, enfatizando aún más sobre la complejidad de la red de señalización en la que citoquinas como la IL10 están implicadas. Varios autores no consiguen detectar ninguna asociación^{75, 86, 87, 96, 98, 100, 102, 110, 117-120}, algunos objetivan un riesgo incrementado de



RA en el caso del haplotipo de baja producción^{20, 83, 85, 104, 121}, mientras que otros lo hacen con los de mayor expresión^{92, 93, 99}.

En nuestro estudio, los SNPs situados en las tres posiciones mencionadas, a nivel de la región promotora del gen, fueron explorados para todos los eventos o variables dependientes, no hallándose una asociación significativa con ninguno de ellos. **No se objetivó una mejor evolución de los trasplantados renales con el haplotipo GCC, de forma que tuvieron similar incidencia de RA, FRR e infecciones virales que los no portadores** (Tablas 16, 19, 22, 25, 28). **Tampoco la supervivencia del injerto fue más prolongada** en los portadores del teórico haplotipo protector o de mayor producción (94,6% vs 92,1% a 5 años, $p=0,253$) (Tabla 32, Figura 24).

La ausencia de efecto de los polimorfismos de la IL10 en los resultados del trasplante renal puede venir dado por el efecto dual de esta citoquina. Por un lado, se ha descrito una acción antiinflamatoria, en relación con su capacidad para inhibir la respuesta th1, disminuyendo la expresión de moléculas HLA de clase II y la producción de IL2 por las células T, junto a otras citoquinas proinflamatorias. Sin embargo, IL10 promueve la activación de células B, regula la producción de inmunoglobulinas y mantiene la viabilidad de las células B por inhibición de la apoptosis¹²², lo que podría incrementar el riesgo de rechazo. Otra explicación para la ausencia de asociación puede ser que el efecto de la IL10 sea débil o esté anulado por la producción de citoquinas con acción opuesta o proinflamatoria.

VIII.3 SNP de INF γ +874T/A

El INF γ es producido tanto por células pertenecientes a la inmunidad innata como adquirida. En el caso de su polimorfismo, tampoco encontramos diferencias en la frecuencia de los genotipos, en función de que los pacientes presentaran RA, FRR o



infecciones virales. **Los portadores del alelo T, asociado con mayor producción, no mostraron más riesgo de RA o FRR.** El papel del sistema inmune en el contexto del trasplante es complejo e involucra a muchos genes, que pueden tener una acción antagónica con la del SNP evaluado.

Los datos de la literatura son bastante controvertidos en cuanto a la influencia de este polimorfismo en los resultados del trasplante renal. Existe una mayor predominancia de estudios que no detectan asociación alguna^{75, 83, 88, 96, 97, 99, 100}, como es nuestro caso, frente a los que si encuentran un mayor riesgo de RA^{93, 104, 120, 123} o de desarrollo de nefropatía crónica del injerto^{109, 124} en los portadores del alelo T.

Con respecto a las infecciones virales, tampoco encontramos una asociación significativa en nuestro estudio, al igual que Alakulppi et al¹²⁵, que concluyeron que los polimorfismos de IL10, IL6 e IFN γ en el receptor no influían en la incidencia de infección por CMV. Datos similares fueron publicados en trasplante pulmonar¹¹² y cardíaco¹¹³. Más contradictorios aún fueron los resultados obtenidos en trasplante pulmonar por Mitsani et al.¹¹¹, que detectaron que los portadores del genotipo TT tuvieron mayor riesgo de desarrollar enfermedad por CMV (OR=4,8; IC: 1,7-13,5; p=0,004), pero, en el caso de presentar viremia, carga viral a título más bajo (p=0,03). Recientemente, se han publicado dos estudios por Vu D et al, uno evaluó la asociación del SNP +874 A/T con la infección por CMV¹¹⁴ y otro con viurs BK¹²⁶. En el caso de la serie que analizó la infección por CMV, detectaron que los portadores del alelo A tienen el doble de riesgo de desarrollar infección (OR=2,01; IC 95%: 1,25-3,36; p=0,012), pero no incluyeron todas las variables documentadas y biológicamente relevantes en el análisis multivariable; además, la población no se encontraba en EHW. En la serie que evaluó la infección por virus BK, demostraron que el genotipo TT era un marcador de protección frente a BK (OR=0,72; IC 95%: 0,40-1,20, p=0,04), pero estos



datos no pueden ser concluyentes al tratarse de una población de raza muy diversa (hispanos, asiáticos, afroamericanos y caucásicos), que no se encontraban en EHW.

VIII.4 SNP -137 G/C de la IL18

Estudios que investiguen la asociación entre este polimorfismo y los resultados del trasplante renal son escasos. En nuestra serie de receptores renales, **no hemos observado una relación con la incidencia de RA** (OR=0,77; IC 95%: 0,32-1,87; $p=0,574$). Esta ausencia de relación no quiere decir que la IL18 no esté implicada en la alorrespuesta inmune. De hecho, hay autores que han descrito la presencia de niveles más elevados de IL18 en pacientes trasplantados renales con RA frente a los que no tenían rechazo⁶⁰. Sin embargo, el efecto puede no ser tan potente o verse enmascarado por una mayor predominancia de la acción del TNF α , que, como hemos visto, presenta una asociación clara. En la literatura, existen pocos estudios que analicen este polimorfismo y su relación con el rechazo en el trasplante renal, los que hay son mayoritariamente de diseño caso-control y además presentan resultados contrapuestos. Mientras que algunos autores encuentran que los portadores del alelo G tienen mayor riesgo de RA^{127, 128}, otros no detectan ninguna asociación^{129, 130}. Tampoco se ha demostrado asociación con el filtrado glomerular a corto plazo medido mediante la fórmula de Cockcroft Gault¹³¹.

Sin embargo, si hemos encontrado una relación con la FRR **en el caso de injertos procedentes de donantes en asistolia. Los pacientes portadores del alelo G, de mayor producción de IL18, tuvieron 2,76 veces más riesgo de FRR ($p=0,042$) y esta asociación fue independiente del tiempo de permanencia en diálisis del receptor, previo al trasplante.** Esto puede estar en relación con el hecho de que los riñones de donantes en asistolia, sometidos a un mayor daño isquémico, presentan necrosis tubular aguda en un porcentaje alto de casos, con regeneración completa



del epitelio tubular, y se ha visto que estas células tubulares tienen capacidad para sintetizar IL18. Striz et al describieron un **aumento de la expresión de IL18 constitutiva en el epitelio del túbulo contorneado distal** de pacientes trasplantados renales, por lo que **polimorfismos genéticos que aumenten su expresión pueden incrementar la lesión inflamatoria y retrasar los mecanismos de reparación**¹³². La influencia de este polimorfismo en la incidencia de FRR de los pacientes sometidos a trasplante renal de donante en muerte encefálica, puede no ser tan importante porque suele existir menor afectación tubular (Figura 19).

Dado que en los receptores de injertos de donantes en muerte encefálica, el SNP asociado a FRR es el del TNF α , nuestro estudio es el primero en detectar **diferencias a nivel de los mecanismos moleculares relacionados con la FRR entre injertos procedentes de donantes en asistolia y en muerte encefálica**. Siempre se ha especulado sobre la posible existencia de procesos muy distintos, con una muy dispar influencia en la función renal a largo plazo. Como se ha demostrado previamente en la literatura, la presencia de FRR en injertos de donantes en asistolia no tiene impacto en la supervivencia¹³³, al contrario de lo que ocurre en el caso de los de muerte encefálica.

También objetivamos una relación entre el SNP de la IL18 y la incidencia de infección por CMV. **Los receptores portadores del alelo de mayor producción tuvieron un riesgo incrementado de infección (OR=2,79; IC 95%: 1,01-7,78; p=0,049) y ésta no se modificó a pesar utilizar profilaxis con valganciclovir** (Figura 20). El alelo G mostró un efecto dosis, de forma que el riesgo de infección fue mayor en los homocigotos (datos no mostrados).

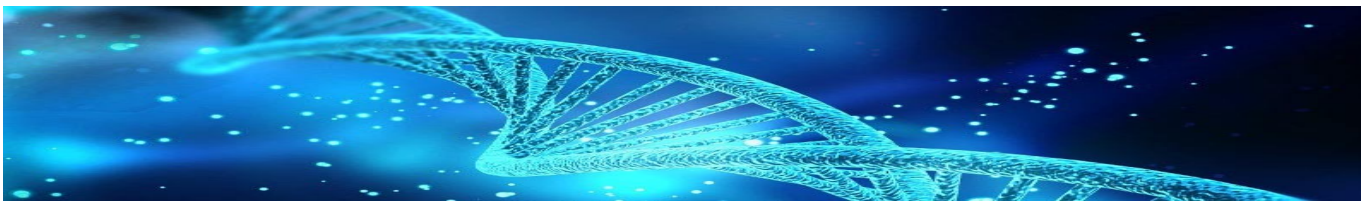
Varias líneas de investigación sugieren que polimorfismos de la IL18 juega un papel importante en las infecciones virales, participando en el aclaramiento del virus en sangre, en el desarrollo de enfermedad y en la respuesta al tratamiento. Se cree que los portadores del genotipo de mayor expresión de IL18 pueden tener menor riesgo de



infección viral. Sin embargo, nuestros resultados muestran una asociación inversa, como ocurre en otras series con la hepatitis crónica por virus B o la infección por HTLV1 en población no trasplantada^{134, 135}. El haplotipo -137G/-607C se relaciona con mayor riesgo de infección por VIH¹³⁶⁻¹³⁸, pero no está claro el mecanismo. Nosotros postulamos que el **polimorfismo de mayor producción favorece la infección viral al estimular los linfocitos T, infectados previamente con el virus.**



IX CONCLUSIONES



8.1 El polimorfismo del $\text{TNF}\alpha$ -308G/A, relacionado con una diferente producción según el genotipo, puede asociarse a mayor riesgo de rechazo agudo vascular. Su determinación previa al trasplante puede ayudarnos a categorizar el riesgo inmunológico del receptor y a individualizar el tratamiento inmunosupresor a administrar.

8.2 El tratamiento de inducción con timoglobulina podría disminuir el riesgo de rechazo agudo, sobre todo en el grupo de mayor incidencia, los portadores del alelo A.

8.3 El SNP -308G/A del $\text{TNF}\alpha$ y el -137G/C de la IL18 pueden ser marcadores de riesgo de FRR en los pacientes que reciben un injerto procedente de un donante en muerte encefálica y asistolia, respectivamente. La asignación del órgano y el manejo del receptor debería adecuarse a los resultados de estos polimorfismos para intentar disminuir la incidencia de FRR.

8.4 Los pacientes portadores del alelo G de la IL18 -137G/C tienen un riesgo de infección por CMV más elevado que los no portadores, que no parece que pueda ser modificado con la administración profiláctica de valganciclovir.

8.5 No se detecta asociación significativa de los polimorfismos genéticos en la supervivencia del injerto renal.

8.6 La incidencia de infección por poliomavirus BK no parece modificarse por ningún polimorfismo evaluado.



X BIBLIOGRAFIA



1. System USRD. USRDS Annual Report 2012. <http://www.usrds.org/adr.aspx> 2012.
2. Dunn TB, Noreen H, Gillingham K, *et al.* Revisiting traditional risk factors for rejection and graft loss after kidney transplantation. *Am J Transplant* 2011; **11**: 2132-2143.
3. Lamb KE, Lodhi S, Meier-Kriesche HU. Long-term renal allograft survival in the United States: a critical reappraisal. *Am J Transplant* 2011; **11**: 450-462.
4. Gondos A, Dohler B, Brenner H, *et al.* Kidney graft survival in Europe and the United States: strikingly different long-term outcomes. *Transplantation* 2013; **95**: 267-274.
5. Pascual J, Zamora J, Pirsch JD. A systematic review of kidney transplantation from expanded criteria donors. *Am J Kidney Dis* 2008; **52**: 553-586.
6. ONT. Memoria 2014 de ONT sobre datos de donación y trasplante. <http://www.ont.es/infesp/Paginas/Memorias.aspx> 2014.
7. Oien CM, Reisaeter AV, Leivestad T, *et al.* Living donor kidney transplantation: the effects of donor age and gender on short- and long-term outcomes. *Transplantation* 2007; **83**: 600-606.
8. Lebranchu Y, Baan C, Biancone L, *et al.* Pretransplant identification of acute rejection risk following kidney transplantation. *Transpl Int* 2014; **27**: 129-138.
9. Cole EH, Johnston O, Rose CL, *et al.* Impact of acute rejection and new-onset diabetes on long-term transplant graft and patient survival. *Clin J Am Soc Nephrol* 2008; **3**: 814-821.
10. Pallardo Mateu LM, Sancho Calabuig A, Capdevila Plaza L, *et al.* Acute rejection and late renal transplant failure: risk factors and prognosis. *Nephrol Dial Transplant* 2004; **19 Suppl 3**: iii38-42.
11. Gore JL, Pham PT, Danovitch GM, *et al.* Obesity and outcome following renal transplantation. *Am J Transplant* 2006; **6**: 357-363.
12. Quiroga I, McShane P, Koo DD, *et al.* Major effects of delayed graft function and cold ischaemia time on renal allograft survival. *Nephrol Dial Transplant* 2006; **21**: 1689-1696.
13. Domingues EM, Matuck T, Graciano ML, *et al.* Panel reactive HLA antibodies, soluble CD30 levels, and acute rejection six months following renal transplant. *Clin Transplant* 2010; **24**: 821-829.
14. Lee KW, Kim SJ, Lee DS, *et al.* Effect of panel-reactive antibody positivity on graft rejection before or after kidney transplantation. *Transplant Proc* 2004; **36**: 2009-2010.



15. Lefaucheur C, Loupy A, Hill GS, *et al.* Preexisting donor-specific HLA antibodies predict outcome in kidney transplantation. *J Am Soc Nephrol* 2010; **21**: 1398-1406.
16. Yarlagadda SG, Coca SG, Formica RN, Jr., *et al.* Association between delayed graft function and allograft and patient survival: a systematic review and meta-analysis. *Nephrol Dial Transplant* 2009; **24**: 1039-1047.
17. Jayaram D, Kommareddi M, Sung RS, *et al.* Delayed graft function requiring more than one-time dialysis treatment is associated with inferior clinical outcomes. *Clin Transplant* 2012; **26**: E536-543.
18. Parekh J, Bostrom A, Feng S. Diabetes mellitus: a risk factor for delayed graft function after deceased donor kidney transplantation. *Am J Transplant* 2010; **10**: 298-303.
19. Baan CC, Weimar W. Intragraft cytokine gene expression: implications for clinical transplantation. *Transpl Int* 1998; **11**: 169-180.
20. Khan F, Agrawal S, Agrawal S. Genetic predisposition and renal allograft failure: implication of non-HLA genetic variants. *Mol Diagn Ther* 2006; **10**: 205-219.
21. Waller JR, Nicholson ML. Molecular mechanisms of renal allograft fibrosis. *Br J Surg* 2001; **88**: 1429-1441.
22. Wilson AG, Symons JA, McDowell TL, *et al.* Effects of a polymorphism in the human tumor necrosis factor alpha promoter on transcriptional activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; **94**: 3195-3199.
23. Murphy KM TP, Walport M. . Immunobiology, 7th ed. *Garland Science* 2007.
24. Male D BJ, Roth D, Roitt I. . Immunologia, 7ª ed. . *Madrid, Elsevier* 2007.
25. Sherman LA, Chattopadhyay S. The molecular basis of allorecognition. *Annu Rev Immunol* 1993; **11**: 385-402.
26. Liu Z, Colovai AI, Tugulea S, *et al.* Indirect recognition of donor HLA-DR peptides in organ allograft rejection. *J Clin Invest* 1996; **98**: 1150-1157.
27. Sayegh MH, Turka LA. The role of T-cell costimulatory activation pathways in transplant rejection. *N Engl J Med* 1998; **338**: 1813-1821.
28. Lakkis FG, Sayegh MH. Memory T cells: a hurdle to immunologic tolerance. *J Am Soc Nephrol* 2003; **14**: 2402-2410.
29. Su CA, Fairchild RL. Memory T Cells in Transplantation. *Curr Transplant Rep* 2014; **1**: 137-146.
30. ten Berge I, Heutinck K, Yapici U, *et al.* The interplay between antiviral immunity and allo-immune reactivity after renal transplantation: consortium



- between the Centres Amsterdam, Leiden and Nijmegen (ALLOVIR). *Transpl Immunol* 2014; **31**: 191-194.
31. Vella JP, Magee C, Vos L, *et al.* Cellular and humoral mechanisms of vascularized allograft rejection induced by indirect recognition of donor MHC allopeptides. *Transplantation* 1999; **67**: 1523-1532.
 32. Fairchild RL. Raising the direction signposts that guide T cell trafficking into allografts. *Transplantation* 2005; **79**: 646-647.
 33. Nankivell BJ, Alexander SI. Rejection of the kidney allograft. *N Engl J Med* 2010; **363**: 1451-1462.
 34. Medawar PB. Immunological tolerance. *Science* 1961; **133**: 303-306.
 35. Medawar PB. Immunological tolerance. *Nature* 1961; **189**: 14-17.
 36. Madariaga ML, Kreisel D, Madsen JC. Organ-specific differences in achieving tolerance. *Curr Opin Organ Transplant* 2015; **20**: 392-399.
 37. Habicht A, Sayegh MH. T cell costimulatory pathways in allograft rejection and tolerance: what's new? *Current Opinion in Organ Transplantation* 2007; **12**: 17-22.
 38. Joffre O, Santolaria T, Calise D, *et al.* Prevention of acute and chronic allograft rejection with CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T lymphocytes. *Nat Med* 2008; **14**: 88-92.
 39. Bonventre JV, Yang L. Cellular pathophysiology of ischemic acute kidney injury. *J Clin Invest* 2011; **121**: 4210-4221.
 40. Le Dorze M, Legrand M, Payen D, *et al.* The role of the microcirculation in acute kidney injury. *Curr Opin Crit Care* 2009; **15**: 503-508.
 41. Mason J, Torhorst J, Welsch J. Role of the medullary perfusion defect in the pathogenesis of ischemic renal failure. *Kidney Int* 1984; **26**: 283-293.
 42. Sprague AH, Khalil RA. Inflammatory cytokines in vascular dysfunction and vascular disease. *Biochem Pharmacol* 2009; **78**: 539-552.
 43. Bonventre JV, Zuk A. Ischemic acute renal failure: an inflammatory disease? *Kidney Int* 2004; **66**: 480-485.
 44. da Silveira KD, Pompermayer Bosco KS, Diniz LR, *et al.* ACE2-angiotensin-(1-7)-Mas axis in renal ischaemia/reperfusion injury in rats. *Clin Sci (Lond)* 2010; **119**: 385-394.
 45. Rabelink TJ, de Boer HC, van Zonneveld AJ. Endothelial activation and circulating markers of endothelial activation in kidney disease. *Nat Rev Nephrol* 2010; **6**: 404-414.



46. Basile DP, Fredrich K, Chelladurai B, *et al.* Renal ischemia reperfusion inhibits VEGF expression and induces ADAMTS-1, a novel VEGF inhibitor. *Am J Physiol Renal Physiol* 2008; **294**: F928-936.
47. Niemann-Masanek U, Mueller A, Yard BA, *et al.* B7-1 (CD80) and B7-2 (CD 86) expression in human tubular epithelial cells in vivo and in vitro. *Nephron* 2002; **92**: 542-556.
48. Wahl P, Schoop R, Bilic G, *et al.* Renal tubular epithelial expression of the costimulatory molecule B7RP-1 (inducible costimulator ligand). *J Am Soc Nephrol* 2002; **13**: 1517-1526.
49. Awad AS, Rouse M, Huang L, *et al.* Compartmentalization of neutrophils in the kidney and lung following acute ischemic kidney injury. *Kidney Int* 2009; **75**: 689-698.
50. Li L, Huang L, Sung SS, *et al.* The chemokine receptors CCR2 and CX3CR1 mediate monocyte/macrophage trafficking in kidney ischemia-reperfusion injury. *Kidney Int* 2008; **74**: 1526-1537.
51. Geissmann F, Jung S, Littman DR. Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties. *Immunity* 2003; **19**: 71-82.
52. Burne MJ, Daniels F, El Ghandour A, *et al.* Identification of the CD4(+) T cell as a major pathogenic factor in ischemic acute renal failure. *J Clin Invest* 2001; **108**: 1283-1290.
53. Gandolfo MT, Jang HR, Bagnasco SM, *et al.* Foxp3+ regulatory T cells participate in repair of ischemic acute kidney injury. *Kidney Int* 2009; **76**: 717-729.
54. Vassalli P. The pathophysiology of tumor necrosis factors. *Annu Rev Immunol* 1992; **10**: 411-452.
55. Hajeer AH, Hutchinson IV. Influence of TNFalpha gene polymorphisms on TNFalpha production and disease. *Hum Immunol* 2001; **62**: 1191-1199.
56. Kroeger KM, Carville KS, Abraham LJ. The -308 tumor necrosis factor-alpha promoter polymorphism effects transcription. *Mol Immunol* 1997; **34**: 391-399.
57. Bouma G, Crusius JB, Oudkerk Pool M, *et al.* Secretion of tumour necrosis factor alpha and lymphotoxin alpha in relation to polymorphisms in the TNF genes and HLA-DR alleles. Relevance for inflammatory bowel disease. *Scand J Immunol* 1996; **43**: 456-463.
58. Cornell LD, Smith RN, Colvin RB. Kidney transplantation: mechanisms of rejection and acceptance. *Annu Rev Pathol* 2008; **3**: 189-220.
59. Puren AJ, Fantuzzi G, Dinarello CA. Gene expression, synthesis, and secretion of interleukin 18 and interleukin 1beta are differentially regulated in human



- blood mononuclear cells and mouse spleen cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; **96**: 2256-2261.
60. Striz I, Krasna E, Honsova E, *et al.* Interleukin 18 (IL-18) upregulation in acute rejection of kidney allograft. *Immunol Lett* 2005; **99**: 30-35.
 61. Giedraitis V, He B, Huang WX, *et al.* Cloning and mutation analysis of the human IL-18 promoter: a possible role of polymorphisms in expression regulation. *J Neuroimmunol* 2001; **112**: 146-152.
 62. Awad MR, Webber S, Boyle G, *et al.* The effect of cytokine gene polymorphisms on pediatric heart allograft outcome. *J Heart Lung Transplant* 2001; **20**: 625-630.
 63. Pravica V, Asderakis A, Perrey C, *et al.* In vitro production of IFN-gamma correlates with CA repeat polymorphism in the human IFN-gamma gene. *Eur J Immunogenet* 1999; **26**: 1-3.
 64. Kittles RA, Weiss KM. Race, ancestry, and genes: implications for defining disease risk. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2003; **4**: 33-67.
 65. Smith EM, Cadet P, Stefano GB, *et al.* IL-10 as a mediator in the HPA axis and brain. *J Neuroimmunol* 1999; **100**: 140-148.
 66. Crawley E, Kay R, Sillibourne J, *et al.* Polymorphic haplotypes of the interleukin-10 5' flanking region determine variable interleukin-10 transcription and are associated with particular phenotypes of juvenile rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1999; **42**: 1101-1108.
 67. Eskdale J, Gallagher G, Verweij CL, *et al.* Interleukin 10 secretion in relation to human IL-10 locus haplotypes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; **95**: 9465-9470.
 68. Tagore A, Gonsalkorale WM, Pravica V, *et al.* Interleukin-10 (IL-10) genotypes in inflammatory bowel disease. *Tissue Antigens* 1999; **54**: 386-390.
 69. Trikalinos TA, Salanti G, Khoury MJ, *et al.* Impact of violations and deviations in Hardy-Weinberg equilibrium on postulated gene-disease associations. *Am J Epidemiol* 2006; **163**: 300-309.
 70. Racusen LC, Solez K, Colvin RB, *et al.* The Banff 97 working classification of renal allograft pathology. *Kidney Int* 1999; **55**: 713-723.
 71. Sis B, Mengel M, Haas M, *et al.* Banff '09 meeting report: antibody mediated graft deterioration and implementation of Banff working groups. *Am J Transplant* 2010; **10**: 464-471.
 72. Haas M, Sis B, Racusen LC, *et al.* Banff 2013 meeting report: inclusion of c4d-negative antibody-mediated rejection and antibody-associated arterial lesions. *Am J Transplant* 2014; **14**: 272-283.



73. Legendre C, Canaud G, Martinez F. Factors influencing long-term outcome after kidney transplantation. *Transpl Int* 2014; **27**: 19-27.
74. Wu O, Levy AR, Briggs A, *et al.* Acute rejection and chronic nephropathy: a systematic review of the literature. *Transplantation* 2009; **87**: 1330-1339.
75. Gendzekhadze K, Rivas-Vetencourt P, Montano RF. Risk of adverse post-transplant events after kidney allograft transplantation as predicted by CTLA-4 +49 and TNF-alpha -308 single nucleotide polymorphisms: a preliminary study. *Transpl Immunol* 2006; **16**: 194-199.
76. Hoffmann MW, Wonigeit K, Steinhoff G, *et al.* Production of cytokines (TNF-alpha, IL-1-beta) and endothelial cell activation in human liver allograft rejection. *Transplantation* 1993; **55**: 329-335.
77. Imagawa DK, Millis JM, Olthoff KM, *et al.* The role of tumor necrosis factor in allograft rejection. I. Evidence that elevated levels of tumor necrosis factor-alpha predict rejection following orthotopic liver transplantation. *Transplantation* 1990; **50**: 219-225.
78. Jordan SC, Czer L, Toyoda M, *et al.* Serum cytokine levels in heart allograft recipients: correlation with findings on endomyocardial biopsy. *J Heart Lung Transplant* 1993; **12**: 333-337.
79. Dorge SE, Roux-Lombard P, Dayer JM, *et al.* Plasma levels of tumor necrosis factor (TNF) and soluble TNF receptors in kidney transplant recipients. *Transplantation* 1994; **58**: 1000-1008.
80. McLaughlin PJ, Aikawa A, Davies HM, *et al.* Evaluation of sequential plasma and urinary tumor necrosis factor alpha levels in renal allograft recipients. *Transplantation* 1991; **51**: 1225-1229.
81. Oliveira SG, Oliveira IB, Abensur H, *et al.* Differential expression of cytokines, growth factors, and alpha-smooth muscle actin in renal allograft biopsies. *Transplant Proc* 2002; **34**: 479-481.
82. Hoffmann U, Bergler T, Rihm M, *et al.* Upregulation of TNF receptor type 2 in human and experimental renal allograft rejection. *Am J Transplant* 2009; **9**: 675-686.
83. Alakulppi NS, Kyllonen LE, Jantti VT, *et al.* Cytokine gene polymorphisms and risks of acute rejection and delayed graft function after kidney transplantation. *Transplantation* 2004; **78**: 1422-1428.
84. Azzawi M, Hasleton PS, Turner DM, *et al.* Tumor necrosis factor-alpha gene polymorphism and death due to acute cellular rejection in a subgroup of heart transplant recipients. *Hum Immunol* 2001; **62**: 140-142.
85. Grinyo J, Vanrenterghem Y, Nashan B, *et al.* Association of four DNA polymorphisms with acute rejection after kidney transplantation. *Transpl Int* 2008; **21**: 879-891.



86. Hahn AB, Kasten-Jolly JC, Constantino DM, *et al.* TNF-alpha, IL-6, IFN-gamma, and IL-10 gene expression polymorphisms and the IL-4 receptor alpha-chain variant Q576R: effects on renal allograft outcome. *Transplantation* 2001; **72**: 660-665.
87. Manchanda PK, Mittal RD. Analysis of cytokine gene polymorphisms in recipient's matched with living donors on acute rejection after renal transplantation. *Mol Cell Biochem* 2008; **311**: 57-65.
88. Nikolova PN, Ivanova MI, Mihailova SM, *et al.* Cytokine gene polymorphism in kidney transplantation--impact of TGF-beta 1, TNF-alpha and IL-6 on graft outcome. *Transpl Immunol* 2008; **18**: 344-348.
89. Park JY, Park MH, Park H, *et al.* TNF-alpha and TGF-beta1 gene polymorphisms and renal allograft rejection in Koreans. *Tissue Antigens* 2004; **64**: 660-666.
90. Pelletier R, Pravica V, Perrey C, *et al.* Evidence for a genetic predisposition towards acute rejection after kidney and simultaneous kidney-pancreas transplantation. *Transplantation* 2000; **70**: 674-680.
91. Poli F, Boschiero L, Giannoni F, *et al.* Tumour necrosis factor-alpha gene polymorphism: implications in kidney transplantation. *Cytokine* 2000; **12**: 1778-1783.
92. Sankaran D, Asderakis A, Ashraf S, *et al.* Cytokine gene polymorphisms predict acute graft rejection following renal transplantation. *Kidney Int* 1999; **56**: 281-288.
93. Tinckam K, Rush D, Hutchinson I, *et al.* The relative importance of cytokine gene polymorphisms in the development of early and late acute rejection and six-month renal allograft pathology. *Transplantation* 2005; **79**: 836-841.
94. Turner DM, Grant SC, Lamb WR, *et al.* A genetic marker of high TNF-alpha production in heart transplant recipients. *Transplantation* 1995; **60**: 1113-1117.
95. Wramner LG, Norrby J, Hahn-Zoric M, *et al.* Impaired kidney graft survival is associated with the TNF-alpha genotype. *Transplantation* 2004; **78**: 117-121.
96. Azarpira N, Aghdai MH, Raisjalali GA, *et al.* Influence of recipient and donor IL-10, TNFA and INFG genotypes on the incidence of acute renal allograft rejection. *Mol Biol Rep* 2009; **36**: 1621-1626.
97. Brabcova I, Petrasek J, Hribova P, *et al.* Genetic variability of major inflammatory mediators has no impact on the outcome of kidney transplantation. *Transplantation* 2007; **84**: 1037-1044.
98. Breulmann B, Bantis C, Siekierka M, *et al.* Influence of cytokine genes polymorphisms on long-term outcome in renal transplantation. *Clin Transplant* 2007; **21**: 615-621.



99. Dhaouadi T, Sfar I, Bardi R, *et al.* Cytokine gene polymorphisms in kidney transplantation. *Transplant Proc* 2013; **45**: 2152-2157.
100. Dmitrienko S, Hoar DI, Balshaw R, *et al.* Immune response gene polymorphisms in renal transplant recipients. *Transplantation* 2005; **80**: 1773-1782.
101. Lee H, Clark B, Gooi HC, *et al.* Influence of recipient and donor IL-1alpha, IL-4, and TNFalpha genotypes on the incidence of acute renal allograft rejection. *J Clin Pathol* 2004; **57**: 101-103.
102. Marshall SE, McLaren AJ, Haldar NA, *et al.* The impact of recipient cytokine genotype on acute rejection after renal transplantation. *Transplantation* 2000; **70**: 1485-1491.
103. Hu X, Bai Y, Li S, *et al.* Donor or recipient TNF-A -308G/A polymorphism and acute rejection of renal allograft: A meta-analysis. *Transpl Immunol* 2011; **25**: 61-71.
104. McDaniel DO, Barber WH, Nguyen C, *et al.* Combined analysis of cytokine genotype polymorphism and the level of expression with allograft function in African-American renal transplant patients. *Transpl Immunol* 2003; **11**: 107-119.
105. Pawlik A, Domanski L, Rozanski J, *et al.* The cytokine gene polymorphisms in patients with chronic kidney graft rejection. *Transpl Immunol* 2005; **14**: 49-52.
106. Poli F, Boschiero L, Giannoni F, *et al.* TNF-alpha IFN-gamma IL-6, IL-10, and TGF-beta1 gene polymorphisms in renal allografts. *Transplant Proc* 2001; **33**: 348-349.
107. Beiras-Fernandez A, Chappell D, Hammer C, *et al.* Impact of polyclonal antithymocyte globulins on the expression of adhesion and inflammation molecules after ischemia-reperfusion injury. *Transpl Immunol* 2009; **20**: 224-228.
108. Preville X, Flacher M, LeMauff B, *et al.* Mechanisms involved in antithymocyte globulin immunosuppressive activity in a nonhuman primate model. *Transplantation* 2001; **71**: 460-468.
109. Hoffmann S, Park J, Jacobson LM, *et al.* Donor genomics influence graft events: the effect of donor polymorphisms on acute rejection and chronic allograft nephropathy. *Kidney Int* 2004; **66**: 1686-1693.
110. Mytilineos J, Laux G, Opelz G. Relevance of IL10, TGFbeta1, TNFalpha, and IL4Ralpha gene polymorphisms in kidney transplantation: a collaborative transplant study report. *Am J Transplant* 2004; **4**: 1684-1690.
111. Mitsani D, Nguyen MH, Girnita DM, *et al.* A polymorphism linked to elevated levels of interferon-gamma is associated with an increased risk of



- cytomegalovirus disease among Caucasian lung transplant recipients at a single center. *J Heart Lung Transplant* 2011; **30**: 523-529.
112. Mu HJ, Xie P, Chen JY, *et al.* Association of TNF-alpha, TGF-beta1, IL-10, IL-6, and IFN-gamma gene polymorphism with acute rejection and infection in lung transplant recipients. *Clin Transplant* 2014; **28**: 1016-1024.
 113. Gourley IS, Denofrio D, Rand W, *et al.* The effect of recipient cytokine gene polymorphism on cardiac transplantation outcome. *Hum Immunol* 2004; **65**: 248-254.
 114. Vu D, Shah T, Ansari J, *et al.* Interferon-gamma gene polymorphism +874 A/T is associated with an increased risk of cytomegalovirus infection among Hispanic renal transplant recipients. *Transpl Infect Dis* 2014; **16**: 724-732.
 115. Perrey C, Pravica V, Sinnott PJ, *et al.* Genotyping for polymorphisms in interferon-gamma, interleukin-10, transforming growth factor-beta 1 and tumour necrosis factor-alpha genes: a technical report. *Transpl Immunol* 1998; **6**: 193-197.
 116. Warle MC, Farhan A, Metselaar HJ, *et al.* Are cytokine gene polymorphisms related to in vitro cytokine production profiles? *Liver Transpl* 2003; **9**: 170-181.
 117. Alakulppi NS, Kyllonen LE, Partanen J, *et al.* Lack of association between thrombosis-associated and cytokine candidate gene polymorphisms and acute rejection or vascular complications after kidney transplantation. *Nephrol Dial Transplant* 2008; **23**: 364-368.
 118. Cartwright NH, Keen LJ, Demaine AG, *et al.* A study of cytokine gene polymorphisms and protein secretion in renal transplantation. *Transpl Immunol* 2001; **8**: 237-244.
 119. Loucaidou M, Stitchbury J, Lee J, *et al.* Cytokine polymorphisms do not influence acute rejection in renal transplantation under tacrolimus-based immunosuppression. *Transplant Proc* 2005; **37**: 1760-1761.
 120. Omrani MD, Mokhtari MR, Bagheri M, *et al.* Association of interleukin-10, interferon-gamma, transforming growth factor-beta, and tumor necrosis factor-alpha gene polymorphisms with long-term kidney allograft survival. *Iran J Kidney Dis* 2012; **4**: 141-146.
 121. Asderakis A, Sankaran D, Dyer P, *et al.* Association of polymorphisms in the human interferon-gamma and interleukin-10 gene with acute and chronic kidney transplant outcome: the cytokine effect on transplantation. *Transplantation* 2001; **71**: 674-677.
 122. Moore KW, de Waal Malefyt R, Coffman RL, *et al.* Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol* 2001; **19**: 683-765.



123. Mendoza-Carrera F, Ojeda-Duran S, Angulo E, *et al.* Influence of cytokine and intercellular adhesion molecule-1 gene polymorphisms on acute rejection in pediatric renal transplantation. *Pediatr Transplant* 2008; **12**: 755-761.
124. Crispim JC, Wastowski IJ, Rassi DM, *et al.* Interferon-gamma +874 polymorphism in the first intron of the human interferon-gamma gene and kidney allograft outcome. *Transplant Proc* 2010; **42**: 4505-4508.
125. Alakulppi NS, Kyllonen LE, Salo HM, *et al.* The impact of donor cytokine gene polymorphisms on the incidence of cytomegalovirus infection after kidney transplantation. *Transpl Immunol* 2006; **16**: 258-262.
126. Vu D, Sakharkar P, Shah T, *et al.* Association of interferon gamma gene polymorphisms with BK virus infection among Hispanic renal allograft recipients. *Transplantation* 2014; **97**: 660-667.
127. Kim CD, Ryu HM, Choi JY, *et al.* Association of G-137C IL-18 promoter polymorphism with acute allograft rejection in renal transplant recipients. *Transplantation* 2008; **86**: 1610-1614.
128. Mittal RD, Srivastava P, Singh V, *et al.* Association of common variants of vascular endothelial growth factor and interleukin-18 genes with allograft survival in renal transplant recipients of North India. *DNA Cell Biol* 2011; **30**: 309-315.
129. Kolesar L, Novota P, Krasna E, *et al.* Polymorphism of interleukin-18 promoter influences the onset of kidney graft function after transplantation. *Tissue Antigens* 2007; **70**: 363-368.
130. Pawlus J, Sierocka A, Tejchman K, *et al.* The impact of interleukin 12B (1188A>C), interleukin 16 (-295T>C), and interleukin 18 (607C>A, 137G>C) gene polymorphisms on long-term renal transplant function and recipient outcomes. *Transplant Proc* 2014; **46**: 2079-2082.
131. do Nascimento WG, Cilio DA, Genre J, *et al.* Genetic polymorphisms of Interleukin-18 are not associated with allograft function in kidney transplant recipients. *Genet Mol Biol* 2014; **37**: 343-349.
132. Khanna A. Interleukin-18, a potential mediator of inflammation, oxidative stress, and allograft dysfunction. *Transplantation* 2011; **91**: 590-591.
133. Sanchez-Fructuoso AI, Marques M, Prats D, *et al.* Victims of cardiac arrest occurring outside the hospital: a source of transplantable kidneys. *Ann Intern Med* 2006; **145**: 157-164.
134. Motavaf M, Safari S, Alavian SM. Interleukin 18 gene promoter polymorphisms and susceptibility to chronic hepatitis B infection: a review study. *Hepat Mon* 2014; **14**: e19879.
135. Rocha-Junior MC, Haddad R, Cilio Alves DC, *et al.* Interleukin-18 and interferon-gamma polymorphisms are implicated on proviral load and




- susceptibility to human T-lymphotropic virus type 1 infection. *Tissue Antigens* 2012; **80**: 143-150.
136. Segat L, Bevilacqua D, Boniotto M, *et al.* IL-18 gene promoter polymorphism is involved in HIV-1 infection in a Brazilian pediatric population. *Immunogenetics* 2006; **58**: 471-473.
137. Sobti R, Sharma V, Abitew A, *et al.* IL-18 Gene Promoter Region 607C/A Polymorphism in HIV-1 Infected North Indian Population. *Balkan J Med Genet* 2011; **14**: 41-48.
138. Sobti RC, Sharma VL, Abitew AM, *et al.* The -137G/C polymorphism of interleukin 18 promoter and risk of HIV-1 infection and its progression to AIDS. *Acta Virol* 2011; **55**: 353-356.



XI ANEXO



	<h2>Consentimiento Informado</h2>
---	-----------------------------------

Hoja de Información al Paciente y Consentimiento

Antes de proceder a la firma del consentimiento informado le rogamos lea la siguiente información.

Espacio para la etiqueta
identificativa del paciente

Aspectos Generales

La participación en el estudio es completamente **voluntaria** y su decisión no afectará a su atención médica

Los objetivos del estudio, riesgos, inconvenientes, molestias o cualquier otro tipo de información sobre el mismo que usted requiera le serán facilitados por su médico.

Si usted da su consentimiento, en cualquier momento **puede revocarlo** e incluso solicitar la destrucción de las muestras obtenidas.

Título del Estudio

Estudio de polimorfismos genéticos en pacientes trasplantados renales.

Objetivo del Estudio

El objetivo principal es poder establecer marcadores genéticos que puedan ser predictores eficaces de la evolución del trasplante.

Para el estudio, sólo se precisa la obtención de una muestra de sangre.

Beneficios Esperados

Se espera poder profundizar en el conocimiento de las bases genéticas que puedan estar implicadas en supervivencia del injerto renal.

Posibles Efectos Adversos Derivados del Estudio

En el caso de la extracción de una muestra de sangre, sólo se esperan las molestias y riesgos menores que puedan derivarse de su obtención mediante venopunción.

Confidencialidad de los Datos y Seguridad de la Muestra e Información Clínica

De acuerdo con la normativa española y de la Comunidad Europea, su muestra de ADN, y su información clínica será guardada de forma independiente de su información personal, es decir, sus datos del estudio estarán codificados. La información que usted nos proporcione será manejada siguiendo las recomendaciones de la ley de protección de datos vigente (Ley orgánica de protección de datos de carácter personal (LOPD) 15/1999 de 13 de diciembre).

Sus datos serán incluidos en un/unos fichero/s cuyo/s responsable/s son el Biobanco y/o el Hospital Clínico San Carlos. Usted podrá ejercer los derechos de acceso, rectificación, cancelación u oposición, poniéndose en contacto con el Biobanco o con el Servicio de Nefrología.

En el caso que estas investigaciones proporcionen **datos que pudieran ser relevantes** para su salud o la de su familia, tiene derecho a que le sean comunicados, si así lo desea. Si la información es relevante para su familia, le corresponderá a usted decidir si quiere o no comunicárselo.

Cesión de remanentes



Los remanentes de su muestra, podrán ser empleados en otros estudios de la misma línea de investigación del Servicio de Nefrología.

Si **NO** desea ceder los remanentes al Servicio de Nefrología marque la siguiente casilla ☐

Cesión a estudios nacionales/internacionales

Su muestra o los remanentes, podrán ser cedidos para estudios nacionales/internacionales de la misma línea de investigación.

Si **NO** desea ceder su muestra/remanente para estudios nacionales/internacionales marque la siguiente casilla ☐

Consentimiento
<p>Yo, (Nombre y Apellidos)..... con DNI</p> <p>Manifiesto que he leído con detenimiento el documento, he entendido todas las explicaciones y he podido realizar cuantas preguntas he estimado oportunas. Por ello doy mi consentimiento para participar en el estudio y para donar la muestra correspondiente.</p> <p>Fecha y Firma</p>

Firmado por del padre/madre o tutor en el caso de menores de edad ☐

Nombre y firma del responsable que le ha proporcionado la información:

Le agradecemos su desinteresada colaboración con el avance de la ciencia y la medicina
SE LE PROPORCIONARÁ UNA COPIA DE ESTE DOCUMENTO SI LO SOLICITA

